

THESIS

BONN

1969

IMMUNELEKTROPHORETISCHE UNTERSUCHUNGEN
AN SERUM UND AN IM WÄSSRIGEN MILIEU
LÖSLICHEN HAUTPROTEINEN VON RATTEN NACH
KORTIKOSTEROIDGABEN

Inaugural-Dissertation
zur
Erlangung der Doktorwürde
der
Hohen Medizinischen Fakultät
der
Rheinischen Friedrich-Wilhelms-Universität
zu
BONN

vorgelegt von
EDGAR LARNOLD
aus
NORDHAUSEN

BONN 1969

IMMUNELEKTROPHORETISCHE UNTERSUCHUNGEN
AN SERUM UND AN IM WÄSSRIGEN MILIEU
LÖSLICHEN HAUTPROTEINEN VON RATTEN NACH
KORTIKOSTEROIDGABEN

Inaugural-Dissertation
zur
Erlangung der Doktorwürde
der
Hohen Medizinischen Fakultät
der
Rheinischen Friedrich-Wilhelms-Universität
zu
BONN

vorgelegt von

EDGAR ARNOLD

aus

NORDHAUSEN

BONN 1969

Angefertigt mit Genehmigung der
Medizinischen Fakultät der Universität Bonn

Referent: Prof. Dr. med. A. Leinbrock

Tag der mündlichen Prüfung: 28. März 1969

Aus der Universitätsklinik und Poliklinik
für Haut- und Geschlechtskrankheiten

Direktor: Prof. Dr. med. A. Leinbrock

Druck: Rheinische Friedrich-Wilhelms-Universität
B o n n

Meiner Mutter



Digitized by the Internet Archive
in 2026

Disposition

1. Einleitung und Problemstellung
2. Aufbau der interstitiellen Hautsubstanz anhand der Literatur
3. Angriffspunkte der Kortikosteroide in der Haut anhand der Literatur
4. Eigene Untersuchungen
 41. Material und Methode
 411. Aufbereitung der Haut
 412. Immunisierung und Antiserumgewinnung
 413. Kortikosteroidapplikation
 414. Durchführung der Immunelektrophorese
 42. Ergebnisse
 43. Diskussion
5. Zusammenfassung
6. Legenden und Abbildungen
7. Literatur-Verzeichnis

Einleitung und Problemstellung

Nachdem TISELIUS (151), ANTWEILER (4-6) und LABHART & STAUB (89) die einfache Elektrophorese und GRABAR & WILLIAMS (52, 53) die Immunelektrophorese inauguriert hatten, haben beide Methoden durch ständige Ausweitung der Möglichkeiten, sich ihrer zu Stoffanalysen zu bedienen, die den Chemikern entweder noch zu aufwendig oder überhaupt noch nicht möglich sind, Zugang in alle Labors der Eiweißforschung gefunden. Schon bald beschränkte man sie nicht mehr auf die Untersuchung der Körpersäfte allein, sondern unterzog nun auch Körperorgane - isoliert und zum Vergleich - dieser neuen Art der Eiweißanalyse in dem Maße, in dem es gelang, aus ihnen lösliche Extrakte herzustellen. Wie anderswo in der Grundlagenforschung widmet sich seitdem die Dermatologie mit wachsendem Interesse der Aufgabe, die Ursachen für stoffwechselbedingte Erkrankungen auch der Haut in der Molekularbiologie und Immunologie der Organ- und Serumproteine aufzudecken. LEINBROCK (92-99) hat als einer der Ersten dazu maßgebliche Forschungsbeiträge geliefert. Pathologische Veränderungen der Haut dienen als Anlaß, jetzt nicht nur morphologische, sondern auch chemische, elektrophoretische und immunologische Eiweißstudien zu betreiben. Auf dieser zum großen Teil noch verborgenen, aber mehr und mehr erarbeiteten Untersuchungsebene wird die ätiologische Verflechtung zwischen Hautläsionen und (latenten oder manifesten) Krankheitsprozessen in hautfernen Regionen des Organismus immer offenkundiger. So können qualitativ oder quantitativ pathologische Eiweißveränderungen der Haut zu entsprechenden im Serum und in anderen Organen führen und umgekehrt.

Schon seit Bestehen der Stress-Theorie von SELYE (135) und den ersten klinischen Erfahrungen mit Kortison an der Mayo-Klinik (62) wurde wiederholt (2, 79, 138, 10, 115, 108, 1) die Vermutung geäußert, daß ein kausaler Zusammenhang zwischen Striae cutis distensae und einer gesteigerten Aktivität der Nebennierenrinde besteht. Die Zusammenfassung der histologischen Hautbefunde von HAUSER (59), EPSTEIN et al. (40) und ADAM & CRAIG (1) sowie derjenigen von MANCINI et al. (105)¹⁾ und BAKER & MONTES (12) an iatrogen provozier-

1) Man lese ihre systematische Übersicht.

ten Hautveränderungen besagt folgendes:

1. Nichtentzündlicher, atrophischer Prozeß, der sich im wesentlichen im $\frac{1}{2}$ Korium abspielt.¹⁾
2. Streckung, Splitterung und Auftrennung und schließlich Untergang der elastischen Fasern²⁾, wahrscheinlich infolge einer aufgehobenen Zementierungsleistung des Elastomuzins.
3. Ähnliche Verdünnung, Spaltung und Verklumpung der kollagenen Faserbündel mit Beschränkung auf enge Bezirke.

Diese pathomorphologischen Beobachtungen und die Kenntnisse der normalen biochemischen Zusammensetzung der Haut sowie der Stoffwechselwirkungen der Glykokortikoide auf die Hautproteine geben die Basis für den Versuch ab, die pathogenetische Verbindung zwischen histologischem und molekularem Bereich zu finden, d.h. zwischen dem, was man mit dem Auge direkt erkennen kann, und dem, was nur durch chemische und physikalische Analysen indirekt zu ermitteln ist. Zu letzterem sollen die Experimente dieser Arbeit einen Beitrag leisten, wobei es gilt, Änderungen des Hautproteinmusters unter längerer und hochdosierter Kortikosteroidgabe mit der Methode der Immunelektrophorese nachzuweisen, was nach dem Studium der Literatur bisher noch nicht ausgeführt worden war.

Aufbau der interstitiellen Hautsubstanz anhand der Literatur

Die Gruppe der Mukopolysaccharide³⁾ (bzw. Mukoproteine³⁾) und das Kollagen schlechthin sind mit Abstand zu weiteren Substanzen die chemischen Hauptkomponenten im spezifischen Hautgerüst⁴⁾. Sie kommen intra (88)- und vor allem extrazellulär vor, d.h., daß sie

1) Da auch später die Epidermis atrophiert, wird der Hinweis von SEILERN-ASPANG et al. (134) gerade durch dieses Beispiel bekräftigt, daß "die Struktur der Dermis verantwortlich für die Kontrolle der Epidermis" ist.

2) Widerspruch bei CASTOR & BAKER (27)

3) Einteilung und Nomenklatur werden von WHITE und Mitarb. (158) sowie von BUDDECKE (24) übersichtlich erläutert.

4) RAGAN (117) gibt eine gute Übersicht über das dynamische Geschehen in der Haut unter physiologischen Verhältnissen.

von den Fibroblasten und Mastzellen des Gewebes synthetisiert und in teilweise noch unreifem Zustand an die amorphe Matrix abgesondert werden¹⁾. Ihre besonderen Aufgaben liegen im interstitiellen Raum, wo sie Stütz-, Ernährungs- und Depotfunktionen wahrzunehmen haben. Die Verteilung ist überwiegend so geregelt, daß die Mukopolysaccharide bzw. -proteine die sog. Grundsubstanz ausmachen²⁾, in der das kollagene und elastische Fasermaterial eingebettet liegt. Jedoch kommt auch ein bedeutend geringerer, aber sehr wichtiger Anteil der Mukoproteine³⁾ als vernetzende Kittsubstanz zwischen den Epidermiszellen oder -fasern (47) und den Fasern des Koriums (117, 51, 74) vor, welcher sich histologisch durch eine milde Reaktion des Kollagens auf PAS kundtut (45). JACKSON & BENTLEY (74) glauben, daß diese Mukoproteine während der Ausbildung des Fasergitters, die sich nach der Sekretion des noch gelösten Kollagens in der eiweißreichen Matrix vollzieht, gleichsam in die Falle geraten sind und dann mit ihren aktiven Gruppen Wasserstoffbrücken zu den anliegenden Kollagenmolekülen herstellen. Dadurch werden α -Tropokollagen-Stränge zusätzlich⁴⁾ vernetzt, so daß stabilere β - und γ -Tropokollagen-Filamente entstehen.

Angriffspunkte der Kortikosteroide in der Haut anhand der Literatur

Dieses gesamte interstitielle Material und die Zellen aller Schichten der Haut unterliegen quantitativ und qualitativ den Einflüssen des Alterns (146, 159, 30) und der Regelung durch Hormone

-
- 1) Verschiedene Beobachtungen über die Fibrogenese innerhalb und außerhalb der Zelle geben JORPES & YAMASHINA (77), WOOD (161, 160) und ZELICKSON (162). Die Bildung der Grundsubstanz beschrieben zuerst GERSH & CATCHEPOLE (50).
 - 2) Der Hauptbestandteil der Mukopolysaccharide ist die Hyaluronsäure (144).
 - 3) Nach HOFFMANN et al. (64) und FLESCH & ESODA (47) ist der wesentliche Bestandteil das Chondroitinsulfat-B. DORFMAN (33) gibt den Hexosamingehalt des Kollagens mit ca. 0,5% an.
 - 4) Die überwiegende Vernetzung wird durch Brückenbildung zwischen den Kollagenmolekülen untereinander besorgt (140, 61).

(117, 73, 38, 39), vor allem durch die Kortikosteroide der Nebennierenrinde. Aus der sehr umfangreichen Literatur über die Wirkung der Kortikosteroide auf die Haut (insbesondere auf das Kori-um)¹⁾, möge an dieser Stelle in aller Kürze nur eine zusammenfassende Orientierung über die möglichen Angriffspunkte gegeben werden.

Nach einer hochdosierten Kortison²⁾-Behandlung nehmen alle Bauelemente der Haut im Sinne des Eiweißkatabolismus³⁾ ab. Beide Wege, die Neubildungshemmung und die Abbaubeschleunigung, werden besprochen. Während über ersteren in den im Schrifttum geäußerten Forschermeinungen Übereinstimmung und Klarheit zu bestehen scheint, sind die Details im Abbau der verschiedenen Bestandteile heftigst umstritten, vor allem hinsichtlich des Verhaltens der Grundsubstanz.

Da sowohl die Mukoproteine und Mukopolysaccharide als auch das Kollagen in den Fibroblasten und nach ASBOE-HANSEN (9) auch in den Mastzellen synthetisiert und von dort in die Matrix sezerniert werden, ist die von vielen Autoren beobachtete Verminderung von Zahl und Größe der Fibroblasten (27, 117, 85, 105, 81), der Mastzellen (9, 28, 105) und sogar schon ihrer mesenchymalen Vorstufen (117, 163) gleichbedeutend mit einer erheblichen Produktionsdrosselung des Kollagens (117, 82, 112, 87, 81) - der eine Abnahme des neutral und alkalisch löslichen⁴⁾ Kollagens (also der jüngsten Form des Kollagens) folgt (139, 136) - und auch der Mukopolysaccharide (28, 85)⁵⁾.

-
- 1) Der biologische Nachweis der endogenen NNR-Hormone in der Haut ist von FAZEKAS (42) geführt worden. RAUSCHKOLB & RAUSCHKOLB (118) ermittelten, daß mehr als die Hälfte des Steroides nach intravenöser Injektion in der intrazellulären Flüssigkeit oder in den geformten Elementen anwesend ist. Es handelt sich um eine Wirkung am Ort.
 - 2) Im folgenden Text als Gattungsbegriff gemeint.
 - 3) siehe Seite 34 und Seite 37
 - 4) HEIKKINEN & KULONEN (61) geben eine Übersicht über die Arten der Kollagenlöslichkeit.
 - 5) Es liegen darüber auch Angaben von MANCINI & SACERDOTE-DE-LUSTIG (104) vor, die gesehen haben, daß "die Bildung saurer Mukopolysaccharide im Innern der Zelle und ihr Auftreten in der Umgebung durch Kortison in der Gewebeskultur gehemmt wird" (78).

GÜNTHER, DULCE & SCHÜTTE (55) stellten jedoch sowohl bei Kortisonbehandlung als auch nach Adrenalektomie einen quantitativen Gleichstand der Mukopolysaccharide¹⁾ fest und befinden sich damit im Widerspruch zu LAYTON (91), SOBEL & MARMORSTON (145) et al. (144), HOUCK et al. (136, 65, 67, 68), SMITH (141), SCHILLER et al. (131)²⁾ und LORENZEN & ZACHARIAE (101), die eine teilweise sogar beträchtliche Verminderung der Grundsubstanz und der Mukopolysaccharide als deren Ausdruck nachweisen konnten. Ob diese berichteten Abnahmen auf das Konto der Synthesestörungen oder auf das eines durch Kortison verstärkt in Gang gesetzten Spaltungsmechanismus gehen, ist nicht ersichtlich³⁾. Ebenso ist hinsichtlich der Spaltung unklar, ob es sich nur um einen Mukopolysaccharid-umbau (55) im Sinne einer flüchtigen Depolymerisation mit sofort folgender Neu-Polymerisation oder um einen -abbau aufgrund einer eindeutigen Depolymerisation oder sogar nur um die (Ab-) Spaltung der Eiweißkomponente von den Mukopolysacchariden (68) handelt. ASADI et al. (7) bemerkten in der Grundsubstanz nach Kortison- und ACTH-Gaben elektronenoptische Anzeichen für die Zunahme des Polymerisationsgrades. Das berührt die Hemmung der Hyaluronidase⁴⁾ durch Kortison (113, 16, 37, 10), die zu einer Viskositätserrhöhung der Grundsubstanz führen kann (20), auf jeden Fall aber den Polymerisationsgrad stabilisiert. Aber nicht nur die Grundsubstanz wird verringert (?), sondern auch das sog. unlösliche Kollagen (136, 141, 65, 67, 68). Seine Abnahme äußert sich chemisch in der Zunahme der im sauren Bereich extrahierbaren⁵⁾ Kollagenfraktion (139, 136, 67, 112). Während CASTOR & BAKER (27), LAYTON (91), SETHI et al. (136)

1) erkennbar am Hexosamingehalt

2) SCHILLER et al. (131) registrierten den sauren Mukopolysaccharidgehalt der Rattenhaut getrennt nach Hyaluronsäure und Chondroitinschwefelsäure im Anschluß an die Behandlung mit Hydrokortison und Prednisolon, wobei sie die Merkwürdigkeit feststellten, daß die Hyaluronsäure ausnahmsweise nach Prednisolongabe deutlich vermehrt ist.

3) HUNT & BLANCHARD (71) sprechen dem Kortison einen ähnlichen Effekt zu wie der Hyaluronidase (109, 38).

4) Nach HOFFMANN et al. (64) wird von den Chondroitinsulfaten (A, B, C) das Chondroitinsulfat-B ("dermatan sulfate" der Angelsachsen), welches in der Haut vorherrschend ist (158), durch Hyaluronidasen nicht gespalten.

5) siehe Fußnote Nr. 4 auf Seite 9

und HOUCK (65) vom Abbau des Kollagens überzeugt sind, ziehen NIMNI & BAVETTA (112) die Schlußfolgerung aus ihren Rattenexperimenten, daß Kortikoide nicht nur die Synthese des Kollagens hindern, sondern auch seinen Abbau verzögern. Den zweiten Effekt halten sie sogar für vorrangig. Wie ist nun der Hormoneinfluß auf die polysaccharidische Umhüllung bzw. Kittsubstanz der kollagenen Fasern? Nach GLYNN & READING (51) "reduzieren alle Mittel, die die Innigkeit dieser Beziehungen zerstören, die Stabilität des Materials in vivo". Es ist strittig, ob Kortison dazuzuzählen ist, d.h. ob es durch Depolymerisation der kittenden Mukopolysaccharide und damit Abriß der vernetzenden Brücken zwischen den Molekülen des Tropokollagens zu einer Aufsplitterung der kollagenen Fasern und somit jüngerer Teile des Kollagens führt, womit die histologischen Erscheinungen der Striae cutis leicht zu vereinbaren wären. CARSTEN et al. (26) plädieren dafür, daß die NNR-Hormone geradezu "erforderlich sind, um die bekannte Struktur von Kollagenfibrillen zu erhalten". Die Angaben von MISSMAHL & BETZ (110) schließen sich dieser Meinung sinngemäß an.

Es besteht kein Zweifel, daß auch die Basalmembranen in irgendeiner Weise durch Kortison beeinflußt werden, sind sie doch trotz aller genetischen und strukturellen Unterschiede (114) entweder aus dem Material der Grundsubstanz weitgehend konstruiert (50) oder bestehen aus Retikulinfasern, die jungem Kollagenmaterial entsprechen, oder sind zumindest mit diesem eng verwoben (114).

Über das chemische Verhalten der elastischen Fasern ist ebenso wie über ihre Herkunft bis heute nichts bekannt (117, 38).

Geht man dem Wesen für die von KINDLER (81) untersuchte Hemmung des Eiweißstoffwechsels der Fibroblasten und damit den Gründen der Synthesestörungen nach, so findet man hinsichtlich des Kollagens ein Nachlassen des Hydroxyprolin¹⁾-Einbaus (117) und hinsichtlich der Mukopolysaccharide eine Einbaustörung von N-Acetyl-Gruppen (132) sowie von Schwefel (91, 22, 132).

Außer der Hemmung der Hyaluronidase beeinflussen die Kortikosteroide noch weitere Gewebshormone. So fanden STÜTTGEN & SCHILLING

1) Nach HURYCH & CHVAPIL (72) besteht "eine enge Korrelation zwischen der Konzentration von freiem Hydroxyprolin und der fibrillogenetischen Aktivität der Zellen".

(150) nach Prednisolonbehandlung in vitro einen Anhalt für verstärkte Hautproteolyse. HOUCK & PATEL (68) gelang es nachzuweisen, daß die Steroide zelluläres Material, in dem sich RNS, eine Protease¹⁾ und eine kollagenolytische Aktivität befinden, in den extrazellulären Raum freisetzen²⁾. Diese dermale Protease, welche wahrscheinlich nicht aus den Lysosomen stamme, könne dann einige Proteine in der Grundsubstanz, die an die sauren Mukopolysaccharide gebunden sind, spalten und die Vorstufe einer Kollagenase aktivieren, die wiederum das unlösliche Kollagen andaut. Die Wirkung der NNR-Hormone auf die Lysosomen (34) besteht in der Membranstabilisierung dieser Organellen, so daß deren saure Proteasen am Austritt gehindert werden (156)³⁾.

-
- 1) Optimale Wirksamkeit bei pH 7.0-7.5 (68)
 - 2) Ältere oder mit Dilantin behandelte Tiere sind resistent gegen diesen Effekt (68)
 - 3) Antagonisten sind u.a. die Vitamine A (36, 13) und D₂ (157).

Material und Methode

Aufbereitung der Haut

Es erfolgte in Äthernarkose die Entfernung der Haare auf der Bauchseite der Ratte mit einer kleinen, gebogenen Schere und dann mit dem Rasiermesser. Das durch die Flanken, den Hals und die Leisten begrenzte Hautstück¹⁾ wurde von kranial her abpräpariert. So wie die Brustmuskulatur freigelegt war, wurden außerdem transpektoral das schlagende Herz punktiert und ca. 8 ml Blut zur Ratten-serumgewinnung entnommen. Der Tod trat durch bilateralen Pneumothorax infolge Eröffnung der Brusthöhle ein.

Nach sorgfältiger Entfernung allen anhaftenden Fettgewebes wurden etwa 1-2 g Material durch Zugabe von Kohlensäureschnee in leicht gefrorenem Zustand mit Skalpell und Schere möglichst fein zerkleinert. Die Aufarbeitung des zerteilten Gewebes, welche der von RODERMUND (121) angegebenen Methode entspricht, begann damit, daß es mit 50 ml einer 0,1 M Ammonacetat-Lösung von pH 7,0 versetzt und anschließend unter ständiger Zufügung kleiner Mengen Kohlen-säureschnees in einem Ultra-Turrax-Homogenisator (Fa. Janke & Kunkel KG, Staufen) in ca. 5 min weitgehend zerfetzt wurde. Es folgte für ebenfalls 5 min Dauer die vollständige Homogenisierung des Materials in einer hochtourigen Vibrogen-Zellmühle (Fa. Bühler, Tübingen). Dabei waren zu 2/3 des Volumens Glasperlen ($\varnothing$ 0,45-0,50 mm) zugesetzt. Das Homogenat ließ man unter wiederholtem Umrühren im Kühlschrank bei + 4° C stehen. Nach 24 h kam es in eine Kühl-zentrifuge (Fa. Christ, Osterode), in der es bei 3000 U/min und + 4° C eine halbe Stunde blieb. Der Bodensatz wurde erneut mit 50 ml Ammonacetat-Puffer versetzt, für 5 min der Vibrogen-Zellmühle zugeführt, 24 h stehengelassen und abermals zentrifugiert. Die vereinigten Überstände (Fraktion I) mußten dann durch ein Filter laufen und wurden, um u.a. die Aminosäuren isoliert zu gewinnen, in ein Ultrafiltrationsgerät (Fa. Sartorius, Göttingen) einge-

1) Es entspricht der von DICKERSON & JOHN (35) untersuchten Bauchhaut; sie soll gerade bei Ratten keine durch den Sexus bestimmten Differenzen in ihrer Zusammensetzung haben - im Gegensatz zu Mäusen.

füllt. Nun wurden Ultrafilter (LSG 60 der Fa. Sartorius, Göttingen) von 50 mm $\varnothing$ verwendet. Mit Hilfe eines N_2 -Gas-Druckes von 5 atü kam es zu einer Eindickung auf ca. 1/10 des vorherigen Volumens. Das Material, in welches das noch im Filter hängende aufgenommen wurde, füllte man jetzt in einen Dialysierschlauch (Fa. Kalle AG, Wiesbaden-Biebrich) von 24 mm Breite und dialysierte es gegen 2 l Aqua destillata, das fünfmal im Abstand von einem halben Tag gewechselt wurde, um die Salze zu entfernen. Anschließend folgte die Gefriertrocknung im Lyophilisator (Fa. Christ, Osterode) für 24 h.

Der nach der Zentrifugierung verbliebene Bodensatz wurde von anhaftenden Spuren des ersten Puffers durch gründliches Nutschen befreit und dann mit 50 ml einer 0,5 M Essigsäure versetzt. Das immer noch die Glasperlen enthaltende, jetzt flockige Proteingemisch kam anschließend wieder für 5 min in die Vibrogen-Zellmühle, wurde 24 h bei $+4^{\circ}C$ im Kühlschrank gelagert und 15 min bei 2000 U/min zentrifugiert. Der Überstand wurde vorsichtig abgegossen und wieder durch ein Filter gegeben (Fraktion IIa), dessen Bodensatz man mit 50 ml der gleichen 0,5 M Essigsäure in bekannter Weise erneut aufarbeitete (Fraktion IIb). Die vereinigten Filtrate (Fraktion II) wurden anstelle von Aqua destillata gegen 1/1000 M Essigsäure dialysiert und anschließend lyophilisiert.

Nach Auswaschung des Bodensatzes mit Aqua dest. in der Nutsche und Zugabe von 50 ml eines 0,1 M Natriumborat-HCl-Puffers, dem 6 Mol Harnstoff zugesetzt waren, von pH 8,4 wurde in analoger Weise extrahiert und damit Fraktion III gewonnen. Fraktion IV ergab sich durch Extraktion mit 50 ml des gleichen Puffers wie zuvor, wobei beim ersten Durchgang 250 mg und beim zweiten 500 mg Natriumborhydrid zugesetzt waren. Der letzte Bodensatz wurde verworfen.

Immunisierung und Antiserumgewinnung

Da das von den Behring-Werken beziehbare Antiserum nur allgemein gegen Rattenserum gerichtet ist, war es erforderlich, ein Antiserum zu gewinnen, das darüber hinaus Antikörper gegen spezifi-

sche Proteine in der Rattenhaut enthält, um sämtliche antigen wirksamen Proteine der Haut immunoelektrophoretisch erfassen zu können.

Es mag an dieser Stelle erwähnt werden, daß diese Absicht im Widerspruch zu den Meinungen einiger Forscher steht, welche die immunologische Spezifität von Organproteinen (128) ganz allgemein und von Kollagen der verschiedensten Provenienz (149) verneinen und die substantiellen Charakteristika der einzelnen Organe im wesentlichen in einer unterschiedlichen Proteinrelation zu erkennen glauben (128). RISER et al. (119) jedoch erkannten durch ihre Immunisierungsversuche am Kaninchen, gerade auch mit Haut, daß neben antigenen Gemeinsamkeiten auch Unterschiede und immunologische Kreuzreaktionen durch partielle Antigengemeinschaften der Organsubstanzen vorkommen. Daraus hat sich die wissenschaftliche Rechtfertigung der vorzunehmenden Immunisierung ergeben, zumal auch von mehreren Untersuchern¹⁾ durch verschiedene Verfahren autochthone Hautproteine, welche im Serum also nicht vorkommen, nachgewiesen werden konnten.

So wurde versucht, Kaninchen²⁾ (einer unbezeichneten Mischrasse) über einen längeren Zeitraum mit allen vier Fraktionen aus einer Sammlung von gesunder Rattenhaut beiderlei Geschlechts zu immunisieren, wie es aus Tabelle I hervorgeht. Die Tiere erhielten die Antigeninjektionen, welche durch V₂A-Stahlkanülen (Ø 1,3 mm) und durch geschorene und mit Alkohol gereinigte Hautoberfläche gegeben wurden, in ihre Oberschenkelmuskulatur, wobei die Gesamtmenge der Tagesdosis auf mehrere Portionen und Einstichstellen verteilt wurde, um eine große Kontaktfläche zwischen Antigen und reagierender Körpersubstanz zu erreichen. Es sei hier aber darauf hingewiesen, daß der Injektionsmodus keinen Einfluß auf die Güte der zu bildenden Antikörper hat (119,54). Außerdem wurde jedesmal 1 Ampulle Supracillin^R (Penicillin plus Streptomycin) zur Infektprophylaxe verabfolgt.

1) siehe Seite 32-33

2) HITZIG (63) empfiehlt Kaninchen als sehr geeignete Antikörperbildner.

Datum	17. 2. 1967	20. 2. 1967	16. 3. 1967	18. 3. 1967	12. 4. 1967	3.6.67	9.6.67	27.6.67
Booster-Injektion	-	-	-	-	I.	II.	III.	IV.
Antigengabe	-	3	27	29	54	106	112	130
Antigengabe	-	3	24	2	25	52	6	18
Abstand in Tagen v. der letzten Injektion	-	-	-	-	-	-	-	-
F I	K I 15 mg	K II -	K I 15 mg	K II -	K I 60 mg	K II 20 mg	K I 20 mg	K I 20 mg
F II	-	15 mg	-	15 mg	-	60 mg	-	-
F III	-	15 mg	-	15 mg	-	60 mg	-	-
F IV	-	15 mg	-	15 mg	-	60 mg	-	-
Auflösung in aqua dest. *)	1 ml	1,5 ml	2 ml	1,5 ml	1 ml	1,5 ml	1 ml	1 ml
Vermischung mit Al (OH) ₃	jeweils 1 ml							
Stellenzahl der Infektions-Depote	2	3	4	4	3	2	4	1
Antibiotischer Infektions-Schutz	jeweils 1 Amp. Supracillin R i.m.							

+) Die injizierte Flüssigkeitsmenge erhöhte sich um 1 - 3 ml durch Ausspülen der Gläser mit phys. Kochsalzlösung

TAB. I: IMMUNISIERUNGSSCHEMA

Die erste Blutentnahme ergab jedoch gegen die Erwartung ein Antiserum, das bei der immunologischen Prüfung im Immunodiffusionsgel nach OUCHTERLONY und in der Immunelektrophorese anhand der Präzipitatsbeurteilung nur einen verschwindend geringen Titer an Immunkörpern aufwies. Eine Steigerung der Antigendosis wurde daher notwendig. Das Adsorbens Aluminiumhydroxyd, welches die Antigenresorption im Kaninchen verzögert und damit eine Depotwirkung erreicht (116, 63), wurde nunmehr bei den Boosterinjektionen weggelassen. Bekanntlich sind die Vorzüge eines Hyperimmunserums durch solche "Auffrischungen" mit anamnestischer Reaktion (63) die "präzisere Abprägung gegenüber den determinierenden Gruppen des Antigens" (149). Als Nachteil war die Gefahr in Kauf zu nehmen, daß heterologe Antikörper (bei chemischer Verwandtschaft der determinierenden Antigengruppen) entstünden (56), welche ggf. dann aber durch die Adsorptionsreinigung abgefangen worden wäre, die im Anschluß durchgeführt wurde. Durch die sich über vier Monate hinziehende Prozedur (Tab. II) wurden neben maximalen Quantitäten auch starke Affinitäten der Antikörper (54) im gewonnenen Antiserum zu ihren Partner erreicht.

Ausgenommen von diesem Erfolg blieb die Antikörperproduktion von Kaninchen II, welches mit den Fraktionen II, III und IV konfrontiert worden war. Keine der oben angegebenen immunologischen Testungen erbrachte Präzipitatlinien.

Die ausreichend antikörperhaltigen Seren von Kaninchen I wurden zusammengegeben und als vereinigtes Antiserum benutzt. Durch Einfrieren bei -22°C wurde eine schonende und ausreichende Konservierung erreicht.

Dieses ungereinigte Antiserum genügte, um alle antigenen Eiweiße in der Hautfraktion I nachzuweisen. Um jedoch jene vermuteten löslichen Proteine dieser Fraktion allein darzustellen, die keine Entsprechung im Serum haben, wurde eine Reinigung des gewonnenen Antiserums von gegen Serumproteine gerichteten Antikörpern durch Adsorption an Serumantigene notwendig. Die von RISER et al. (119) angegebene Entfernung der Antikörper gegen Serumeiweiße nach dem Prinzip eines "umgekehrten" indirekten COOMBS-Tests erschien nicht so geeignet wie ein Verfahren, das MACPHERSON & LIAKOPOULOU (102)

Nr.	Datum	Abstand in Tagen nach der			(jeweils) letzten			ungeführte Entnahme- menge		Entnahme- modus	Antikörpertiter im Serum		Ereignungen	Bestand- teil des vereinigten Antiserums
		Antigen- gabe	Booster- Injektion		Blut- entnahme	K I	K II				K I	K II		
1.	6. 4. 67	47	-	-	20	8 ml ^{*)}	7 ml		0		(+)	Ø	*) etwas hämolytisches Serum	nein
2.	28. 4. 67	69	16	16	22	18 ml	20 ml		H		+++	Ø		ja
3.	23. 5. 67	94	41	41	25	25 ml	Ø ^{*)}		H		+	-	*) erfolgloser Entnahmeversuch	nein
4.	6. 6. 67	108	55	3	14	22 ml	Ø ^{*)}		H		++	-	*) erfolgloser Entnahmeversuch	nein
5.	15. 6. 67	117	64	6	9	22 ml	-		H		+++	-		ja
6.	17. 6. 67	119	66	8	2	23 ml	-		H		+++	-		ja
7.	7. 7. 67	139	66	10	20	20 ml	-		H		++++	-		ja
8.	10. 7. 67	142	89	13	3	22 ml	-		H		++++	-		ja

0 = Ohrvenenpunktur
H = Herzpunktur

TAB. II: BLUTENTNAHMESCHEMA ZUR ANTISERUMGEWINNUNG

an gegen Rattenhirn gerichteten Kaninchenantiserum ausprobiert haben. In diesem Falle wurde das Kaninchenantiserum mit Rattenserum im Verhältnis 20:1 versetzt, etwa eine halbe Stunde im Brutschrank bei 37° C aufbewahrt und dann ca. 10 min bei 3500 U/min zentrifugiert. Der Überstand wurde vom weißen Präzipitatbodensatz mit einer Pipette vorsichtig abgesaugt und erneut jetzt im Verhältnis 100:1 mit Rattenserum zusammengebracht. Aufbewahrung im Brutschrank und Zentrifugierung wie zuvor. Nach Entfernung aller Niederschläge lag ein nunmehr gereinigtes Antiserum vor, das bei - 22° C in der Kühltruhe verwahrt wurde.

Kortikosteroidanplikation

Aus der Zucht eines Sprague-Dawley-Stammes wurden Albinoratten¹⁾ mittleren Alters²⁾ von beiderlei Geschlecht und verschiedenem Gewicht ausgewählt (Tabelle III). Die Tiere wurden in mit Zellstoff ausgelegten Einzelhaltungskäfigen aus Makrolon (Typ II der Fa. Presswerk AG, Essen) gehalten und, wie bisher, mit Altromin^R, einem an Vitaminen und Kalorien reichen Standardfutter (Fa. Altromin, Lage/Lippe) und Wasser ad libitum versorgt. Die Raumtemperatur hielt man nach Möglichkeit bei 26° C, um dadurch provozierbare Schwankungen des Thyroxinspiegels im Blut mit ihren Konsequenzen auf den Stoffwechsel im allgemeinen und in der Haut im besonderen (133) zu vermeiden. Für das Experiment wurden grundsätzlich 6 Ratten (R I - R VI) verwendet (Tabelle III), denen 6 Kontrolltiere (Tabelle IV) gegenüberstanden.

Zwei Exemplare (R I und R IV) hatten schon früher Urbason solubile^R erhalten, um einen Anhalt für die Letaldosis dieses Medikamentes zu bekommen. R I waren 18 Tage lang je 14 mg Urbason solubile^R injiziert und anschließend eine Pause von 23 Tagen gewährt worden. R IV erhielt entsprechend 14 Tage lang je 20 mg Urbason solubile^R und 10 Tage Pause. Dabei hatte letztere einen Gewichts-

-
- 1) Diese eignen sich besonders gut für Bindegewebsuntersuchungen (143)
 - 2) SMITH (141) weist auf quantitative Reaktionsdifferenzen verschiedener Altersgruppen hin.

verlust von ca. 15 %, erreichte in der zehntägigen Erholungspause jedoch wieder 90 % ihres Ausgangsgewichts. Zu Beginn des Hauptexperimentes schienen beide Tiere durchaus vital genug - ihre NNR waren demnach nicht irreversibel atrophiert¹⁾ -, um übernommen zu werden.

Ratten sind relativ zu anderen Species (z.B. Mensch) sehr kortisonempfindlich (130). Um möglichen Verlusten vor Abschluß des Experimentes vorzubeugen, unterzog man zwei weitere Ratten (R A und R B) in gleicher Weise der Kortikosteroidbelastung als Reservisten. Die Injektionen wurden in rasierte und-jedesmal zuvor mit Äther gereinigte Stellen abwechselnd beider Hinterbacken mit steriler Nadel intramuskulär gegeben. Während des gesamten Verlaufs erhielten die Ratten auf keine Art Antibiotika zum Schutz gegen drohende Infektionen, um mögliche Interferenzen mit der Kortikosteroidwirkung im Stoffwechsel auszuschalten.

Bei der Auswahl des Glykokortikoids wurde den folgenden zwei synthetischen Steroiden der Vorzug eingeräumt, weil ihnen die mineralokortikoidischen Nebenwirkungen im Gegensatz zu den nativen so gut wie nicht zukommen (76, 20, Hausmitteilungen der Fa. Merck, Darmstadt). Sowohl Medrol (84) als auch Dexamethason (20) haben als Derivate einen wesentlich stärkeren Einfluß auf die Stickstoffbilanz, d.h. proteinkatabole Wirksamkeit²⁾, als Prednisolon. Nebenreaktionen, wie z.B. Steroiddiabetes, sind beim 6- α -Methylprednisolon (Medrol) (84) ebenso wie toxische Erscheinungen (23, Hausmitteilungen der Fa. Farbwerke Hoechst, Frankfurt-Hoechst) um vieles geringer als bei der Muttersubstanz Prednisolon. Wie sich durch den Vorversuch zeigen ließ, wurde eine 14tägige Tagesdosis von 20 mg Urbason sol.^K (6 - α -Methylprednisolon-Na-hemisuccinat) von einer 300 g-Ratte toleriert. Auf dieser Beobachtung basierend, wurde

1) D'ARCY & HOWARD (31) beobachteten nach sechswöchiger Behandlung von Ratten mit diversen Kortikosteroiden, daß die induzierte NNR-Atrophie ein reversibler Prozeß ist, da die Drüsen nach Behandlungsende ihr Gewicht, ihre Histologie und ihre Verteilung des sudanophilen Lipids normalisierten, selbst wenn das Körpergewicht der behandelten Ratten das der Kontrolltiere nicht mehr erreichte.

2) siehe Seite 34 und Seite 37

R I	R II	R III	R A	R IV	R V	R VI	R B	Registratur
♂	♂	♂	♂	♀	♀	♀	♀	Geschlecht
20 1/2 sm	20 1/2 sm	~17 sm	~17 sm	~17 sm	~17 sm	~17 sm	~17 sm	Alter
370 g	350 g	315 g	330 g	270 g	245 g	260 g	230 g	Gewicht
20 mg U.	3,5 mg U.	25 mg U.	20 mg U.	20 mg U.	3,5 mg U.	25 mg U.	20 mg U.	17. 7.
20 mg U.	20 mg U.	25 mg U.	20 mg U.	20 mg U.	20 mg U.	25 mg U.	20 mg U.	18. 7.
20 mg U.	20 mg U.	25 mg U.	20 mg U.	20 mg U.	20 mg U.	25 mg U.	20 mg U.	19. 7.
20 mg U.	20 mg U.	25 mg U.	20 mg U.	20 mg U.	20 mg U.	25 mg U.	20 mg U.	20. 7.
20 mg U.	20 mg U.	25 mg U.	20 mg U.	20 mg U.	20 mg U.	25 mg U.	20 mg U.	21. 7.
20 mg U.	20 mg U.	25 mg U.	20 mg U.	20 mg U.	20 mg U.	25 mg U.	20 mg U.	22. 7.
20 mg U.	20 mg U.	25 mg U.	20 mg U.	20 mg U.	20 mg U.	25 mg U.	20 mg U.	23. 7.
25 mg U.	25 mg U.	25 mg U.	25 mg U.	25 mg U.	25 mg U.	25 mg U.	25 mg U.	24. 7.
25 mg U.	3,5 mg U.	25 mg U.	25 mg U.	25 mg U.	3,5 mg U.	25 mg U.	25 mg U.	25. 7.
25 mg U.	25 mg U.	25 mg U.	25 mg U.	25 mg U.	25 mg U.	25 mg U.	25 mg U.	26. 7.
25 mg U.	25 mg U.	25 mg U.	25 mg U.	25 mg U.	25 mg U.	25 mg U.	25 mg U.	27. 7.
25 mg U.	25 mg U.	25 mg U.	25 mg U.	25 mg U.	25 mg U.	25 mg U.	25 mg U.	28. 7.
25 mg U.	25 mg U.	25 mg U.	25 mg U.	25 mg U.	25 mg U.	25 mg U.	25 mg U.	29. 7.
25 mg U.	25 mg U.	25 mg U.	25 mg U.	10 mg U.	† spontan	25 mg U.	25 mg U.	30. 7.
†	†	†	†	†	†	†	†	31. 7.
340 g	235 g	290 g	?	210 g	?	230 g	200 g	Sterbegericht
~8 g	~33 g	~8 g	?	~22 g	?	~12 g	~13 g	Gewichtsverlust
252 mg U.	-	-	-	280 mg U	-	-	-	Vorbehandlung
655 mg U.	270 mg U.+7 mg U.	350 mg U.	315 mg U.	580 mg U.	225 mg U.+7 mg U.	350 mg U.	315 mg U.	Gesamtosis

U = URBASON SOLUBLE

R

D = FORTECORTIN = KRISTALLSUSPENSION R

TAB. III: KORTISON - APPLIKATIONSSCHEMA

R VII	R VIII	R IX	R X	R XI	R XII	Registrar
♂	♂	♀	♀	♀	♂	Geschlecht
23 sm	~ 24 sm	~ 18 sm	~ 18 sm	~ 18 sm	~ 24 sm	Alter
345 g	330 g	210 g	215 g	235 g	340 g	Gewicht

TAB. IV: KRITERIEN DER UNBEHANDELTEN KONTROLLTIERE

die Dosis von 20-25 mg/kg KG/d des gleichen Medikamentes in dem hier ausgeführten Versuch kalkuliert. Wegen "eines zweiten Gipfels" seiner Wirkung (163), und um den Behandlungsbeginn zu forcieren, kam bei zwei Tieren (R II und R V) Fortecortin-Kristallsuspension^R (Dexamethasondiäthylaminoacetat) zur Anwendung. Seine Tagesdosierung errechnete sich mit Hilfe der Dosierrelation Prednisolon : Dexamethason wie etwa 5:1 (163), 6:1 (Hausmitteilung der Fa. Berck, Darmstadt) bzw. 7:1 (15) als ungefährender Mittelwert zwischen den verschiedenen Angaben. Sowohl Urbason solubile^R als auch Fortecortin-Kristallsuspension^R haben einen sehr raschen Wirkungseintritt von einer halben Stunde (163). Das Wirkungsmaximum liegt bei erstem nach 1 1/2 d, bei letzterem schon nach 4 h; die Wirkungsdauer ist bei beidem bis zu 6 d lang (163). Der Ende der Behandlung wurde auf eine Woche nach Auftreten einer eindeutigen Hautveränderung angesetzt.

Etwa von der sechsten Injektion an fiel auf, daß sich bei mehreren Ratten, besonders bei Aufhebung der Haare "geronien Strien", wie eine struppige und stumpfe Bürste darbot. Die Haut selbst war äußerst zäh, und es gelang nur mit viel Kraft und Geschick, eine Injektionsnadel Nr. 12 einzustechen. Beim Versuch, die verschiebbliche Haut, die vor der Nadel zurückwich, an einem Haarradschiffel festzuhalten, riß dieses mühelos und total unter spärlicher Lösung von seiner Unterlage ab. Schon bald machte sich eine augenscheinliche Gewichtsabnahme bemerkbar, die in jedem Fall auf die Stoffwechselwirkung des Kortikosteroids zurückzuführen ist¹⁾. Sicherlich wird außerdem die als Behandlungsebeneffekt anzusehende und von SOBEL & MARMORSTON (145) ausdrücklich hervor gehobene Herabsetzung der Freßlust dazu beigetragen haben. TONELLI et al. (152) sprechen davon, daß die Abnahme des Nahrungskonsums bei Ratten für 53-65 % des Totalkörpergewichtsverlustes verantwortlich ist. Soweit man sich aus dem vorliegenden Material diese Schlußfolgerung erlauben darf, stimmt unter Geschlechtsberücksichtigung die Gewichtsabnahme mit der Behauptung von SMITH (142), daß männliche

1) In Ergänzung stehen dazu die Äußerungen von SCHILLER et al. (131), die einen Gewichtsverlust an Ratten wohl nach Hydrokortison- aber nicht nach Prednisolon-Injektionen beobachteten.

Ratten ihr Gewicht unter Kortison stärker reduzieren als weibliche, nicht überein (z.B. Vergleich zwischen R I und R IV in Tabelle III).

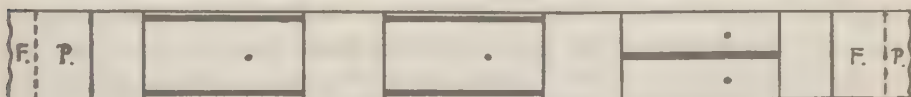
Ratte IV erreichte zwar das Ende der 14tägigen Behandlungsdauer, machte jedoch vor der Tötung einen kranken Eindruck: Einige Anzeichen sprachen für Infektionskrankheit; eine genauere Diagnostik wurde aber nicht durchgeführt. Ratte V starb am vorletzten Tag an einer autopsisch bestätigten Septicopyämie. An ihre Stelle trat Ratte B, deren aufgearbeitete Haut unter der Registriernummer der ersetzten Ratte (V) weiterlief. Ratte A wurde nicht verwendet.

Immunelektrophorese

Die Immunelektrophorese wurde in Anlehnung an die von SCHEIDEGGER (127) angegebene Mikromethode ausgeführt. 1,5 g Reinagar (Fa. Merck, Darmstadt) wurden mit 50 ml Veronalpuffer nach MICHAELIS von pH 8,2 und Ionenstärke 0,1 und gleicher Menge Aqua destillata gemischt und im siedenden Wasserbad 20-25 min lang erhitzt. Dabei trat eine vollständige Verflüssigung des Agars ein, ohne daß ungelöste Schwebeteilchen erkennbar wurden. Um einem Keimwachstum vorzubeugen, erhielt die heiße Lösung eine kleine Messerspitze voll Cialit^R, ehe sie mit Hilfe einer Pipette auf staub- und fettfreie Objektträger (Menzel-Gläser der Ausmaße 76x26x1 mm) aufgetragen wurde, die auf einer überprüften waagerechten Platte im Rähmchen fixiert waren. Die Gelschichtdicke betrug 1,2 mm. Nach dem Erstarren erfolgte bei 2/3 aller gegossenen Agarplatten (A + B) die Stanzung und Aushebung nur eines Loches auf der Längs- und ca. 8 mm entfernt von der Querachse mittels eines LKB-Stanzgerätes. Das letzte Drittel (C) erhielt im Gel zwei kongruente Löcher, deren Abstand von der Längsachse¹⁾ 5,25 mm und von der Querachse 8 mm betrug. Alle Löcher hatten einen Durchmesser von 1,4 mm, in die mit Hilfe einer Mikropipette das Rattenserum bzw. mit einer jedesmal ausgeglühten Nadel die lyophilisierten Hautfraktionen ge-

1) Sie entspricht der Elektrophoreseachse.

langten. Der LKB-Elektrophorese-Apparat wurde jeweils mit neun Agarplättchen in der Anordnung von drei Brücken beschickt. Der elektrische Kontakt zu den Behältern, bei denen die Elektroden in gleichen Mengen Diäthylbarbitursäure-Acetat-Puffer (pH 8,2; $\mu = 0,1$) lagen, kam durch befeuchtete Filterpapierstreifen zustande. Der zugehörige Beckman-Duostat wurde so eingestellt und mehrmals während des Ablaufs kontrolliert, daß in 80 min ein Strom von 40 mA konstant die Agarplättchen durchfloß. Um eine Austrocknung des Gels durch Wärmeentwicklung zu vermeiden, war die Abdeckung der Kammer erforderlich.



A

B

C

Nach beendeter Elektrophorese wurden 1,1 mm breite Rillen in das Gel gestanzt und ausgehoben. Die Agarplättchen mit einem Antigenloch (A + B) erhielten an beiden Längsseiten, ca. 1 mm vom Rand entfernt, je eine Rille, und diejenigen mit zwei Antigenlöchern (C) zwischen diesen auf der Längsachse eine einzige Rille. Mit der Mikropipette wurde dann in diese Rillen Kaninchenantiserum zur Immunodiffusion eingefüllt. Da die jeweiligen Antigenfüllungen nicht genau abzumessen und bestimmbar waren, wurden jetzt, um das optimale Reaktionsverhältnis zwischen Antigenen und Antikörpern zu erreichen, unter vergleichender photographischer Kontrolle von Mal zu Mal kleine Mengen Antiserum nachgefüllt, so daß sich die Gesamtmenge an Antikörpern schrittweise erhöhte. Die Antiserummengen betrugen bei den Gruppen A und B zwischen 0,48 und 0,96 ml, bei Gruppe C zwischen 0,4 und 0,64 ml je Antiserumrille, wobei die größeren Mengen das Behring-Serum¹⁾ betrafen. Dabei zeigte sich, daß die dem Serum-Albumin-Bereich entsprechende Präzipitatzzone im allgemeinen schon wieder an Konturenschärfe verlor, wenn die anderen Linien durch Zugabe von Antiserum gerade erst dem Optimum an Klarheit zustrebten – ein Hinweis darauf, daß es keine

1) siehe dazu auch S. 27

für alle Antigene einheitliche Äquivalenzzonen gibt.

Zwischendurch wurden die Agarplättchen in einer "feuchten Kammer" aufbewahrt. Nach der letzten photographischen Registrierung kamen noch mögliche Antigen-Antikörper-Reaktionen durch 24stündige Lagerung in physiol. Kochsalzlösung durch Auslaugung des noch nicht gebundenen Eiweißes zum Erliegen. Mit aufgelegtem Filterpapier trockneten die Gele über Nacht im Brutschrank bei 37° C. Nach Entfernung der Streifen wurden die Objektträger mit dem zu einer zellophanartigen Schicht verdünnten Agar entweder für eine Nacht in eine Azokarmin- oder für 10-20 min in eine Ponceau-Rot-Lösung (153) gelegt, anschließend mehrfach mit Wasser bzw. 2 %iger Essigsäure abgespült, im Brutschrank vorläufig getrocknet, mit einem Gemisch aus Kanadabalsam und Xylol (1:10) zur Konservierung bestrichen und nun endgültig getrocknet.

Ergebnisse

Die Fraktionen II, III und IV der Rattenhaut ergaben weder mit käuflichem Anti-Rattenserum-Antiserum (Behring-Serum) noch mit ungereinigtem oder gereinigtem Anti-Rattenhaut¹⁾-Antiserum von Kaninchen I und II ein immunoelektrophoretisch nachweisbares Protein. Ebenso verhielt es sich mit der Immunodiffusion des gereinigten Antiserums von Kaninchen I gegen elektrophoretisch getrennte Antigene der Fraktion I. Trotz mehrfacher Wiederholung blieben die Gele unverändert klar. Die zur Beurteilung gekommenen Präzipitatlinien waren nur durch ungereinigtes Antiserum von Kaninchen I bzw. durch Behring-Serum erzeugt worden. Letzteres mußte leider hinzugezogen werden, da durch die notwendigen Vorversuche und die Adsorptionsreinigung die Menge des (ungereinigten) Antiserums eigener Produktion so vermindert worden war, daß sie sich als nicht mehr ausreichend herausstellte. Um die Konzeption am geringsten zu beeinträchtigen, wurde die Immunodiffusion bei der Gruppe der unbehandelten Ratten dem Behring-Serum überlassen.

Die Ungleichheit der methodischen Bedingungen für kortikosteroid-

1) alle Fraktionen

behandelte und unbehandelte Tiere hinsichtlich des Antiserums bedeutet - wie sich herausstellte - nur ein quantitatives Problem. Als Folge der besonderen Extraktionsmethode befanden sich in Fraktion I der Rattenhaut, welche ja nur wasserlösliche Proteine bei neutralem pH enthält, zum allergrößten Teil Rattenserumproteine, geringgradiger Muko- und Glykoproteine der Grundsubstanz (24) und der Zellen sowie lösliche Vorläufer und Abbauprodukte des Kollagens in nennenswerten Beträgen (155). Da aber letztere, ihre Hautspezifität einmal vorausgesetzt, keine Antikörper evozieren konnten, wie der Adsorptionsreinigungsvorgang gezeigt hat, wofür es mehrere Erklärungen¹⁾ gäbe, fiel damit der entscheidende Inhaltsunterschied zwischen käuflichem Behring-Serum, das gegen Rattenserum gerichtet ist, und selbst hergestelltem Antiserum der gleichen Produzentenspecies fort. Wegen der Qualitätsunterschiede beider Antiseren²⁾ wurde auf den direkten Vergleich zwischen behandelten und unbehandelten Ratten (F I zu F I und Serum zu Serum) verzichtet. So kamen nur die Vergleiche zwischen Hautfraktion I und Serum jeweils zur Bewertung. Zusätzlich erschien es statthaft und prinzipiell möglich, hilfsweise beide Differenzen zwischen jeweils Haut- und Serumlinien innerhalb jeder Gruppe zueinander in Beziehung zu setzen. Dabei zwingt die Kenntnis der fraglichen Beweiskraft - d.h. der Anstieg des im direkten Vergleich noch kleinen Fehlers, der an der auf Augenmaß begründeten subjektiven Auswertung liegt, bis an die Grenze der Vertretbarkeit - zu vorsichtigen Formulierungen. Ebenso verhielt es sich mit dem Vergleich von Quantitätsdifferenzen zwischen einzelnen Proteinen oder -gruppen innerhalb eines Immunelektropherogrammes mit dem Analogon der gegenübergestellten Gruppe.

Bei der Betrachtung der Präzipitationslinien dienten Intensität, Länge und Breite als quantitative Bewertungskriterien, da nach HEIDELBERGER & KENDALL (60) die Menge des Immunpräzipitates der Quantität des Antigens proportional ist, soweit sich erreichen läßt, daß die Präzipitate im optimalen Bereich der Äquivalenzzone

1) siehe dazu S. 29

2) Das hier hergestellte Antiserum erwies sich, gemessen an der Schärfe der Präzipitatlinien, als dem käuflichen überlegen.

des Antiserums zustandegekommen sind¹⁾. Außerdem wurde auf nur einseitig vertretene Linien geachtet. Zur Klassifizierung der Serumproteine und der ihnen nomenklatorisch zuzuordnenden löslichen Hautproteine erwiesen sich die Angaben und Skizzen von BOFFA & FINE (19), ESCRIBANO & GRABAR (41), NEUHAUS et al. (111) sowie von DOLEZALOVA et al. (32) als sehr hilfreich.

Im Vergleich der Proteine von der Hautfraktion I mit denen des Serums ergab sich übereinstimmend bei allen unbehandelten Tieren (VII - XII) eine deutliche Gesamtverminderung aller Bereiche. Auszunehmen war das Transferrin als quantitativer Hauptvertreter der β -Globuline, von dem man eher nicht nur eine zu den Partnerproteinen relative sondern sogar auch eine absolute Zunahme annehmen konnte. Das Albumin jedoch wies eine gut erkennbare relative Minderverminderung gegenüber den anderen Eiweißen insbesondere den α -Globulinen auf. Die Quantitätsabnahme der β - und γ -Globuline war augenscheinlich gleichmäßig, wobei die ersteren im Spektrum der löslichen Hautproteine eher ein minimales Übergewicht erhalten zu haben schienen. (γ_1 - und γ_2 -Globuline verhielten sich zueinander konform.) Dagegen fielen die α -Globuline deutlich ab. Die α_1 -Globuline vermittelten den Eindruck, beträchtlich mehr eingebüßt zu haben; ja die α_2 -Globuline waren in Hautfraktion I nur in Spuren zu entdecken.

Eine wohl als Präalbumin zu vermutende kurze Linie stellte sich in der Hautfraktion als von kaum unterschiedlicher Stärke, bei 4 Tieren sogar geringgradig kräftiger als im Serum dar.

Kommt man nun zu dem analogen Vergleich zwischen Hautfraktion I und Serum der behandelten Ratten, so fiel auch hier eine ebenso augenscheinliche Gesamtproteinverminderung auf. Auch hier waren die Linienintensitäten der α -, β - und γ -Globuline stärker geschwächt als beim Albumin. Beim Vergleich der Verminderungsgrade ließ sich der Eindruck gewinnen, daß, jeweils bezogen auf das Verhältnis Hautfraktion I / Serum, folgendes konstatiert werden konnte:

1) siehe oben S.25

Das Transferrin war stärker bzw. eindeutig vermehrt, das Albumin stärker und die α_1 - und γ -Globuline geringer vermindert bei den behandelten als bei den unbehandelten Ratten. In den Hautfraktion-I-Immunoelektropherogrammen der behandelten Ratten war der Unterschied der Linienintensitäten zwischen den γ - und den α_1 -Globulinen wesentlich geringer oder gar nicht ausgeprägt (γ -Globuline $\cong$ α_1 -Globuline) im Gegensatz (γ -Globuline $\gg$ α_1 -Globuline) zu den unbehandelten Ratten.

Die soeben als Präalbumin angenommene Linie zeigte im Vergleich Hautfraktion I / Serum bei den behandelten Tieren keine Intensitätsunterschiede.

Linien ohne Entsprechung schienen an keiner Stelle vorhanden zu sein.

Diskussion

Da die Eluation bei neutraler Reaktion ausgeführt wurde, ist die Gewähr gegeben, daß es sich in der untersuchten Hautfraktion I um native Bestandteile handelt, d.h. keine unnatürlichen Antigene interkurrierten (56). Wenn sich keine Antikörper gegen die Fraktionen II, III und IV, sowie gegen hautspezifische Proteinanteile der Fraktion I nachweisen ließen, so könnte dieses, abgesehen von möglicherweise in der angewandten Immunisierungstechnik liegenden Fehlerquellen, wie insbesondere die geringe Zahl der immunisierten Kaninchen, auf die fehlende oder spärliche Antigenität der betroffenen Hautproteine zurückzuführen sein.

Alles wasserlösliche Eiweiß der Haut gehört einer der drei folgenden Gruppen an:

1. Intravasales Serumeiweiß in Kapillaren und Lymphgefäßen
2. Extravasales Serumeiweiß
3. Spezifisches Hauteiweiß

Der Anteil des in der Aufbereitung der Haut mitverarbeiteten intravasalen Serumeiweiße kann in der Mengenbetrachtung vernachlässigt werden, weil er, wie HUMPHREY et al. (70) subtil untersuchten, mit einem Wert zwischen 0,5 und 0,8 ml/100 g Haut kaum ins Gewicht fällt.

Da man weiß, daß die feinsten Lymphbahnen in ihrem Quellgebiet, dem interstitiellen Raum, ohne filternde Trennmembran frei entspringen und von dort das "Gewebewasser" über die großen Lymphbahnen in das Blutgefäßsystem drainieren, ist es leicht einzusehen, daß zahlreiche Serumeiweiße zuvor im extravasalen Raum beheimatet waren. Andererseits ist von HUMPHREY et al. (70) eine physiologische Fluktuation von Serumeiweißen aus dem Blutkreislauf in die Haut als Eiweißdepot nachgewiesen worden, womit sich eine Art Extrakreislauf mit dazwischengeschaltetem Auf- und Abbau in beiden Milieus ergibt. Nach ihren Angaben beträgt der Gehalt der Kaninchenhaut an Serumproteinen ca. 0,7 g/100 g und ist damit zu 25-30 % demjenigen im zirkulierenden Plasma äquivalent. Außerdem konnten sie ermitteln, daß ungefähr 60 % des in der Haut vorkommenden Albumins jeden Tag durch zirkulierendes Serum-Albumin ersetzt werden. Wie MANCINI et al. (106) histologisch durch radioaktive Markierungen feststellen konnten, brauchen sowohl das Albumin als auch die Globuline bis zu acht Stunden, um sich vom Blut aus in den Bindegewebsstrukturen und der Basalmembran der Dermis zu akkumulieren - wobei sie ihre antigenen Eigenschaften behalten -, und treten nach zwölf Stunden den Rückweg in die Lymphbahnen an.

Wie ebenfalls aus den vorliegenden und auch bereits von RODERMUND (122) veröffentlichten Untersuchungen hervorgeht, bestehen zwischen Haut und Serum oft beträchtliche Mengendifferenzen zwischen wasserlöslichen Haut- und Serumproteinen. Bestimmte, mit (intravasalen) Serumproteinen identische Eiweißkörper zeigen mehr oder weniger Quantitätseinbußen. Das mag daran liegen, daß der Abbau der "Immigranten" verschieden schnell erfolgt (165), vielleicht bei einigen so rapide, daß sie im Extremfall gar nicht mehr zu erfassen wären. Wahrscheinlicher ist aber, daß die Basalmembran eine passive Filtration (165) oder sogar eine aktive Selektion vornimmt, was eine große Bedeutung hat (106) für die Penetration nicht nur vom Blut aus ins Korium, sondern auch vom Korium aus in die Epidermis (3), deren Gehalt an Serumproteinen noch geringer ist (11) und in Verhornungsrichtung mehr und mehr abnimmt (107), weil auch die Kittsubstanz zwischen den Zellen den Durchstrom von Serumeiweißkörpern unterschiedlich gestattet. Im normalen Stratum corne-

um konnte FISHER (43) außer Spuren von Albumin keine Serumproteine mehr nachweisen. Auch die Tatsache, daß die intrazelluläre Flüssigkeit nur eine Fraktion mit der Beweglichkeit von α_2 - β_1 -Globulinen enthält, die auch im Serum anwesend ist, wie BEDNÁŘIK & REJNEK (14) an Lebergewebe immunoelektrophoretisch nachgewiesen haben, mag einer ähnlichen Passageregulation von Serumproteinen durch die Zellmembran unterliegen, wie es von den Basalmembranen angenommen wird.

Hautfraktion I enthielt wasserlösliche Proteine des Interstitiums und der Zellen sowohl vom Korium als auch von der Epidermis, auf deren Gesamtmenge es ankam. In der Konfrontation mit der Literatur darüber sind daher die dort angegebenen Bezugnahmen auf histologische Örtlichkeiten in der Haut in diesem Zusammenhang nur insoweit relevant, als die epidermospezifischen Substanzen im Verhältnis zu den Proteinen des Koriums verschwindend gering sind und deshalb in dieser Arbeit auch nicht sicher in Erscheinung traten. Die Untersuchungsergebnisse der Epidermis seien im folgenden der Vollständigkeit halber ebenfalls referiert.

BOAS (17) stellte elektrophoretisch fest, daß der Bindegewebsextrakt (bei pH 8,6) von Ratten weniger Albumin und weniger β - und γ -Globuline als Normalserum enthält. Auch aus seiner und der Arbeit von RODERMUND (122) geht hervor, daß die Verminderung des Albumins geringer ist als die der β - und δ -Globuline. Wie ZIMMER et al. (164) mitteilten, sind das saure Seromukoid (ein α_1 -Glykoprotein) und die α_2 -Lipoproteine neben mehreren anderen α_2 -Globulinen in der Haut immunoelektrophoretisch nicht nachzuweisen. In einer ergänzenden Arbeit (165) wurde hinzugefügt, daß in der Haut drei bis vier α_2 -Globuline und das β_1 -C-Globulin fehlen. FLEISCHMAJER & KROL (46) konnten in einem NaCl-Extrakt von Menschenkorium zwar alle Immunoglobuline, aber keine β -Lipoproteine finden. Schließlich gab FISHER (44), allerdings nur die Epidermis betreffend, an, daß Transferrin und Spuren von β -Globulinen immunoelektrophoretisch nachzuweisen sind. Das Transferrin ist, wie RODERMUND (122) schreibt, "in einer dem Serum nicht nachstehenden Stärke ausgebildet". ALLANSMITH et al. (3) untersuchten Menschenhaut mit der Immunofluoreszenztechnik und fanden dabei das δ_2 -Globu-

lin als Band im Korium, scharf von der Epidermis durch die Basalmembran getrennt. Ihrer Ansicht nach "scheine sein Ursprung aus dem Plasma wahrscheinlich". Bei der Betrachtung der Immunelektrophogramme der vorliegenden Arbeit waren in allen Darstellungen der Serumproteine zwei antigen verschiedene γ -Globuline anzutreffen mit quantitativ mitunter abweichender, aber identischer Entsprechung im Präzipitatlinienmuster der Hautfraktion I. Es ist möglich, daß es sich bei der zweiten Linie um jenes γ_2 -Globulin handelt. Eine Substanz aus dem von FISHER (44) in der Epidermis aufgespurten Postgammaglobulin, das zum Teil aus Peptiden gleicher Antigenität bestehe, die in epidermalen Zellen gebildet würden und sich in den Hornderivaten anhäuferten, kann es nicht sein, da sie ja auch in den Serumbildern vorkommt.

Mit den diesbezüglichen Ergebnissen dieser Arbeit sind die genannten Angaben aus dem Schrifttum durchaus in Einklang zu bringen. Da das saure (α_1 -) Seromukoid mit dem extrem hohen Kohlenhydratgehalt von 41,4 % (63) und das β_1 -C-Globulin nicht eindeutig identifiziert werden konnten, war es auch nicht möglich, ihre von ZIMMER und Mitarb. (164, 165) behauptete Abwesenheit in der Haut zu überprüfen.

Die veränderte Relation der Serumproteine zueinander in der Grundsubstanz der Haut mag im Zusammenhang mit der Funktion der subendothelialen Basalmembran abhängig sein von Größe, Form, Gewicht und elektrischer Ladung des Eiweißmoleküls (14). Daß auch die Existenz einer Kohlenhydrat- oder Fettkomponente ein Hinderungsgrund für die Passage sein kann, beweisen das saure Seromukoid (α_1 -Glykoprotein) und die Lipoproteine, welche nur im Serum vorkommen.

Neben den "fremden" enthält die Haut auch konstitutive Proteine mit neutraler Löslichkeit, für welche die Basalmembran ebenfalls eine mehr oder weniger durchlässige Sperre in Richtung auf das Blut bedeutet. Die Auswanderung von einigen dieser Proteine in den intravasalen Raum wäre durchaus denkbar, aber nur schwer nachzuweisen, da der Kreislauf sie stark verdünnen würde. So glauben ZIMMER et al. (165), daß ein bestimmtes in der Haut kräftig vorkommendes β_2 -Globulin auch im Serum in Spuren existieren müsse,

oder sogar, daß sich diese Substanz, aus dem Blute kommend, in der Haut besonders stark anzureichern pflege. FISHER (44) konnte neben dem schon erwähnten Postgammaglobulin ein Postalbumin, das er für SH-freie Derivate des Serum-Albumins hält, zwei Proteine der Trans-Beta-Region, wovon das eine ein lösliches, SH-tragendes Prakeratin und das andere ein Glykopeptid sei, und ein β_2 -Globulin, also fünf Proteine mit an Plasmaproteinen nicht vertretenen Determinanten in der Epidermis aufdecken. Wahrscheinlich ist dieses β_1 -Globulin mit dem von ZIMMER et al. (173) bezeichneten β_1 -D-Globulin identisch, welches nach ihrer Auskunft anscheinend im Serum fehlt. Es ist möglich, daß es sich um ein lösliches Mukoprotein der Grundsubstanz handelt. BADEN & FREEDBERG (11) fanden in der Epidermis vier spezifische Proteine im Präalbumin- sowie α - und β -Globulin-Bereich, von denen eines der enzymatischen Verdauung sogar widerstand. Die immunoelektrophoretischen Untersuchungen von FLEISCHMAJER & KROL (46) an Menschenkorium erbrachten zwei Nicht-Serum-Proteine mit der elektrophoretischen Beweglichkeit von β - und δ -Globulinen. Außerdem stellten sie einen gewissen Anteil des Albumins in der Acrylamidgelelektrophorese fest, den sie "Hautalbumin" nannten. In einigen Exemplaren registrierten sie eine Aufspaltung in zwei oder drei Komponenten und zogen daraus die Schlußfolgerung, daß es sich anscheinend um einen Komplex mehrerer Proteine handle, von denen einige vermutlich als in situ synthetisiert oder als Modifikationen des Serum-Albumins aufzufassen seien. Diese "Albuminsplitterung" war auch in mehreren Immunoelektrophogrammen dieser Arbeit aufgefallen, betraf jedoch hier auch die Serumproteindarstellungen.

Die spezifischen Proteine der Epidermis konnten schon mangels Masse in der Hautfraktion I nicht nachgewiesen werden. Ein weiterer Grund ist, daß keine spezifischen Antikörper gegen sie gewonnen werden konnten, wie der Adsorptionsreinigungsprozeß gezeigt hat (s.o.). Gleiches gilt auch für die spezifischen Proteine des Korioms, die in den immunoelektrophoretischen Befunden ebenfalls vermißt werden.

Die Frage des Einflusses von Glykokortikoiden auf die Haut ist primär eine Frage der allgemeinen Wirkung auf den Eiweißstoffwech-

sel überhaupt. Seit Kenntnis der Art ihrer Wirksamkeit (1949) versuchte man zu klären, ob die Eiweißabnahme, erkennbar am Gewichtsverlust des Individuums¹⁾ trotz Vermehrung des Specks (137), durch Förderung des Katabolismus oder Hemmung des Anabolismus zustandekommt. Der Streit, ob nun diese Hormone einen anti-anabolen oder einen katabolen Effekt haben, scheint auch heute noch nicht beigelegt zu sein (29, 83), obwohl sich beide so sehr gegenseitig bedingen, daß er eigentlich nur ein terminologisches Problem darstellt (25). Besser wäre es, in diesem Zusammenhang solche Begriffe zu vermeiden und nur davon zu sprechen, daß Kortison und seine Derivate eine negative Stickstoffbilanz verursachen (148), wie sie üblicherweise durch Harnuntersuchungen ermittelt wird (58). SILBER & PORTER (137) fanden, daß diese Bilanz und der Gewichtsverlust, in direkter Abhängigkeit von der Kortisondosis, im wesentlichen auf die Mobilisierung von Muskel- und Hauteiweiß zurückzuführen sind. Die Beobachtungen während und nach der Urbason^R-Behandlung an den Versuchstieren der in dieser Arbeit beschriebenen Experimente stimmen damit voll überein²⁾. Wie KOCHAKIAN & ROBERTSON (86) zu Recht behaupteten, mag neben dem Eiweißabbau in bestimmten Geweben zur gleichen Zeit an anderer Stelle sogar ein Eiweißaufbau vorstatten gehen. Nach BODANSKY & MONEY (18) nehmen während der Kortisonbehandlung Eiweiß und Organgewicht von Haut, Muskeln, Nebennieren, Lymphknoten, Thymus u.a. ab und von Leber, Nieren und Schilddrüse zu. Der Quotient Eingeweideorgangewicht : Körpergewicht steigt unverkennbar unter der Kortisonwirkung an (134). Da der Abbau in gewissen Organen den Aufbau in bestimmten anderen Organen überwiegt, wird die Stickstoffbilanz negativ. ROBERTS (120) konnte an In-vitro-Versuchen aufzeigen, daß die NNR-Hormone primär die Mobilisierung von Gewebeseiweiß stimulieren. Die freigegebenen Proteine und ihre Derivate gelangen ins Blut (103) und werden als Bestandteile der Plasmaproteine den inneren Organen zur synthetischen Neuverwendung zugeführt. Solche Aminosäurerückstände, welche für die Synthesen nicht gleich verwertbar sind, werden über den Weg der Glykoneogenie zu Glykogen und zu Fett verwandelt (25). Die-

1) eine Beobachtung unzähliger Forscher und auch in den hier ausgeführten Versuchen

2) siehe S. 23

se Prozesse machen die Gewichtszunahmen der großen parenchymatösen Bauchorgane verständlich.

Nach der summarischen Meinung von HAENSCH (58) bestehen "enge Zusammenhänge zwischen Gewebseiweißgehalt und Serumeiweißgehalt unter Kortisonbehandlung". Der Effekt auf das Serumeiweißbild sei jedoch nicht ohne Weiteres erkennbar. Alle im Schrifttum zu findenden Angaben stehen zumindest nicht im Widerspruch zu der von SCHEIFFARTH et al. (129) aufgestellten Regel, daß unter der Kortisonbehandlung "die grobdisperse Phase der Serumeiweißkörper abnimmt, in der Hauptsache das Gammaglobulin, und im ganzen eine Verschiebung der relativen Werte nach der Seite der Albumine erfolgt". So beobachtete HAENSCH (58) im Verlauf der Kortikosteroidtherapie von Patienten mit sehr verschiedenen Dermatosen eine Abnahme der vermehrten, grobdispersen γ -Globuline im Serum, die er auf eine Einwirkung des Hormons auf das reticulo-endotheliale System zurückführt (57).

Das Verhalten der β -Globuline ist unklar und weist möglicherweise auf Speciesunterschiede hin, da BOSSAK (21) eine Verminderung im Serum von Kortison-behandelten Hunden, ROBERTS (120) aber eine Vermehrung nach Gabe eines NNR-Extraktes oder von ACTH an Ratten ermitteln konnten. Letzterer nahm an, daß unter diesem hormonellen Stimulus das Milzgewebe ein dem Serum - β - Globulin nahestehendes Eiweiß ins Blut abgibt, so wie ebenfalls die Leber und in geringerem Maße auch andere Gewebe - wie Versuche an partiell hepatektomierten Ratten gezeigt hätten - ein mit den α -Globulinen des Serums in der Elektrophorese wanderndes Protein nach dem gleichen Modus freisetzen. Er bot zwei Thesendafür an:

1. Der erhöhte Spiegel des zirkulierenden α -Globulins stellt mobilisiertes extrahepatisches Gewebseiweiß während der Translokation zur Leber dar, wo es für Regenerationsprozesse verwertet werden soll.
2. Die Leber, als Hauptquelle dieses Proteins, bildet vermehrt α -Globulin und gibt es an den Kreislauf ab.

Nach HAENSCH (58) bleibt der Serumspiegel der α -Globuline seiner Patienten unbeeinflusst; BOSSAK et al. (21) registrieren an ihren Hunden eine α -Globulin-Zunahme hauptsächlich zugunsten der α_2 -

Globuline. HOWARD et al. (69) wissen zu berichten, daß der Serumspiegel der α -Lipoproteine nach Kortisonadministration und beim CUSHING-Syndrom zunimmt, und erklären diese Tatsache damit, daß die adrenale Androgenbildung durch eine exogene oder endogene Erhöhung des Kortisonspiegels unterdrückt wird. Die Androgenverminderung oder möglicherweise ein noch zusätzlicher Mechanismus würden die α -Lipoprotein-Vermehrung bewirken.

Möglicherweise trägt zur Vermehrung der α -Globuline im Serum das "Hypro-Protein" (100) bei, auf das KEISER et al. (80) zuerst aufmerksam machten. Es handelt sich dabei um ein physiologisch im Serum vorkommendes, nicht dialysierbares, mit Eiweißpräzipitantien auch nicht fällbares, Hydroxyprolin enthaltendes Proteingemisch aus mindestens zwei Komponenten, von denen LeROY et al (100) glauben, daß die größere Komponente (60-80%) "lösliche" Vorläufer der Kollagensynthese und die kleinere ein Fragment aus dem Kollagenabbau repräsentieren. FREY (48) findet in elektrophoretischen Serumauftrennungen die Anwesenheit von (freiem oder in Eiweiß verbautem?) Hydroxyprolin konstant im Bereich der α_2 -Globuline und mitunter auch im Albumin-Gebiet. In der Immunelektrophorese entdecken FREY et al. (49) ein kollagenartiges Antigen, das in der α_2 - β -Lipoprotein-Zone liegt. Da ihr Färbungsversuch mit Sudan-Schwarz BB fehlschlug, folgern sie, daß ein lösliches Kollagen im Serum existiert, das in Beziehung zum Kollagen des Bindegewebes steht. Es ist noch nicht untersucht, aber denkbar, daß, in Kenntnis der mobilisierenden, also auch Kollagen abbauenden Eigenschaft, hohe Kortikosteroiddosen zu einer Spiegelerhöhung des "Hypro-Proteins" führen.

Hinsichtlich der Serum-Albumins sind sich BOSSAK, HAENSCH und SILBER mit ihren Mitarbeitern darin einig, daß Kortikosteroidgaben eine eindeutige Zunahme veranlassen, womit ROBERTS' Beobachtungen nicht konform gehen. ROTHSCCHILD et al. (123) sind der Meinung, daß unter dem Einfluß gewisser KNR-Hormone zwar einerseits ein Abbau des Albumins, der sich vor allem in den extravaskulären Speichern ereignen soll, andererseits aber auch ein Aufbau ähnlichen Ausmaßes vorstatten geht.

Erlaubt man sich nach dem Studium dieser Fakten eine vorsichtige

Quintessenz, so kann man folgendes prinzipiell aussagen:

Eine gewisse Auswahl bodenständiger Bauproteine der Gewebe, vor allem von Muskulatur und Haut¹⁾, die biologisch lösbar sind, wird, wenn auch in unbekanntem Ausmaß²⁾, unter dem Einfluß von KNR-Hormonen mobilisiert und in das Plasma abgegeben³⁾, das diese Proteine als Rohstoffmaterial bestimmt, zu umfangreichen Syntheseleistungen verpflichteten Eingeweideorganen (allen voran die Leber) zuführt, die u.a. auch hochspezialisierte Plasmaproteine bilden (welche selbstverständlich auch in die elektrophoretisch untersuchte Serumproteinbilanz eingehen)⁴⁾. Mit diesem "Grundvorgang" konkurrieren an verschiedenen Stellen - mehr oder weniger synergistisch oder antagonistisch im Endeffekt, teils direkt, teils indirekt durch Rückkopplungen - ebenfalls von Kortikosteroiden ausgelöste Sondermechanismen, welche bisher nur zu einem geringen Teil überschaubar sind:

Der des γ -Globulins (und der des α -Lipoproteins) wurde schon genannt. Wenn also in der Tat im Serum das γ -Globulin schwimmt, müßte dann nicht ebenfalls seine Reduktion in der Haut angenommen werden? Da es aber in letzterer - wie die vorliegenden Ergebnisse kundtun - eine relative Vermehrung (im Vergleich zu den unterhandelten Tieren) erfahren hat - die Konzentration im Serum bleibt natürlich in jedem Fall größer! - kommen folgende, vielleicht sogar kombinierbare Erklärungen für die Kortikosteroidwirkung in Betracht:

1. Aus dem konstitutiven Hauteiweiß sind eine oder mehrere Substanzen mobilisiert, die mit den γ -Globulinen wandern und für die Anti- γ -Globulin-Antikörper des Kaninchenantiseraums attraktiv sind.

-
- 1) "carcass" der Angelsachsen
 - 2) Welche Faktoren für die Mobilisierungsgeraten der einzelnen Proteine verantwortlich sind, liegt völlig im dunkeln.
 - 3) Mehrere - oder alle? - elektrophoretischen Zonen vergrößern sich dabei.
 - 4) Eine Serumprobe enthält daher immer sowohl zuvor abgebautes als auch aufgebautes Proteinmaterial, über dessen genetische Einordnung die Elektrophorese wegen ihrer pauschalen Untersuchungsart keine Auskunft geben kann.

2. Aktive Anreicherung der Serum- γ -Globuline

3. Abbaubremmung der normal infiltrierten Serum- γ -Globuline in der Haut.

Für die 2. und 3. Möglichkeit könnte außerdem eine durchaus als Kortikosteroideffekt anzusehende Permeabilitätserhöhung der Basalmembran¹⁾ zwischen Blut und Korium mitspielen. Die 3. Erklärung ist angesichts der obigen Feststellung über den mobilisierenden bzw. eiweißkatabolen Einfluß der NNR-Hormone mit diesem nicht in Einklang und daher wenig wahrscheinlich. Auch die relative oder sogar absolute Transferrinvermehrung mag allein auf einer Stimulierung zu gesteigerter Infiltration und/oder zu einer (mehr) aktiven Akkumulation beruhen. Da es sich ja um eine genau definierte, hochspezialisierte Substanz von Nicht-Bruchstück-Charakter handelt und seine Synthese anscheinend in der Leber erfolgt (63), wird es mit dem "Grundvorgang" der Mobilisierung von Gewebeeiweiß nichts zu tun haben. Die Reaktion der β -Globuline sei mangels verwertbaren Materials übergangen. Man kann nur sagen, daß sie wohl dem "Grundvorgang" sich anschließen. Daß sich die Relationen der einzelnen Individuen in der β -Globulin-Fraktion zueinander verändern und daß sich Mukoproteine aus der Grundsubstanz des Bindegewebes hinzugesellen, kann lediglich vermutet werden. Auch die α -Globuline stellen eine nach biologischen Gesichtspunkten sehr willkürliche, komplexe Zusammenfassung der verschiedensten Proteine mit voneinander sehr abweichenden Quellen und Bestimmungen dar. Eine Beurteilung ihres Gesamtverhaltens müßte eigentlich zugunsten einer Einzelbetrachtung, die aber hier nicht möglich war, aufgegeben werden. Die relative Vermehrung der α_1 -Globuline in der Haut kann sicherlich genauso erklärt werden wie das Verhalten der γ -Globuline. (Daß nach Kortikosteroidbehandlung die α_1 -Globuline in der Haut reichlicher vertreten sind als die γ -Globuline, könnte an den unterschiedlichen Mobilisierungs- und Metabolisierungsraten im Gewebe liegen. Außerdem wird durch den depressiven Einfluß der NNR-Hormone auf das RES (s.o.) die [andere] Produktion der γ -Globuline vermindert, was sich auf ihren Bestand sowohl im Serum als auch im Gewebe auswirkt [Sondermechanismus].)

1) siehe dazu oben Seite 11

Ob jetzt auch die α -Seromukoide (Orosomukoid und Haptoglobin), von denen JAYLE (75) und SANDOR (125) annehmen, daß sie ihren Ursprung in der Depolymerisation der bindegewebigen Grundsubstanz haben, an der relativen α -Globulin-Vermehrung im Hautextrakt in erkennbaren Mengen teilhaben, bleibt Spekulation, weil sie nicht identifiziert werden konnten¹⁾. Da die Grundsubstanz unter dem Einfluß von NNR-Hormonen abnimmt²⁾, tritt eine Vermehrung der α -Mukoide im Serum auf (75). In den eigenen Ergebnissen wird keine relative Veränderung der α_1 -Globuline in der Haut festgestellt (im Verhältnis zu den unbehandelten Tieren). Das mag an den sehr kleinen Konzentrationen liegen. Man kann aber annehmen, daß sie sich im Prinzip ebenso wie die α_1 -Globuline, in den sich verschiebenden Mengen aber wohl disproportional verhalten. Die Mobilisation löslicher Proteine im Gewebe betrifft das Albumin, das im Normalfall von allen Serumeiweißen am reichlichsten in den extravasalen Speichern vorkommt, ganz und gar nicht, weil es nur in der Leber gebildet werden kann. Sein Spiegelanstieg im Blut kann daher nicht aus dieser reichlichen Quelle, wie es allgemein gilt, stammen, sondern müßte die Folge der durch die gesteigerte Belieferung mit Rohstoffen stimulierten Syntheseleistung in der Leber sein. Ob der von SCHEDL & BARTTER (126) vermutete Kontrollmechanismus für die Bildung von Serumproteinen in der Leber, nach dem das Albumin als eine Art Regelgröße fungiert, wie sie es an seinem Einfluß auf die Serum-Transferrin-Bildung beobachten konnten, hier außerdem eine Rolle spielt, ist wegen der komplexen Verhältnisse nicht zu beurteilen.

Aus all dem geht erneut hervor, daß eine ganze Reihe von Mechanismen, mit einem weitverzweigten Wechselspiel der gegenseitigen Beeinflussung und Abhängigkeit, für endokrin bedingte Verschiebungen im Proteinmuster des Serums und der Gewebe verantwortlich sind.

1) Das Orosomukoid ist außerdem nur ein sehr schwaches Antigen (63).

2) siehe dazu oben S. 10

Zusammenfassung

Zur Klärung der Frage, ob eine hochdosierte Kortikosteroidbehandlung immunoelektrophoretisch faßbare Veränderungen nicht nur im Spektrum der Serumeiweiße sondern auch in dem der wasserlöslichen Hauteiweiße bewirkt, wurden 6 Albinoratten beiderlei Geschlechts und von mittlerem Alter der Applikation extrem starker Dosen von Urbason solubile^R bzw. Fortecortin - Kristallsuspension^R 14 Tage lang unterworfen und mit 6 Kontrolltieren gleicher Ausgangskriterien verglichen. Ihre Häute wurden nach einem besonderen Verfahren aufgearbeitet und die löslichen Proteine extrahiert. Material der so gewonnenen 4 Fraktionen wurde der Immunelektrophorese zugeführt.

Der Wunsch, in der angewandten Untersuchungsmethode über ein spezifisches Kaninchenantiserum gegen Rattenhaut zu verfügen, motivierte die eigene Immunisierung von Kaninchen mit den vier Fraktionen aus einer Sammlung von gesunder Rattenhaut beiderlei Geschlechts und somit die Gewinnung eines Antiserums, das einem Adsorptionsreinigungsprozeß mit Rattenserum unterzogen wurde. Es stellte sich heraus, daß das so gereinigte Antiserum keine durch immunodiffusorische Prüfungen mit allen vier Hautfraktionen nachweisbare Antikörper mehr enthielt, wohingegen das ungereinigte Antiserum sowohl im Serum als auch mit dem Hautantigenkomplex der Fraktion I umfangreiche Präzipitatslinien erbracht hatte. Dementsprechend wurde angenommen, daß ein sehr großer Proteinanteil der Hautfraktion erstens einmal aus dem intravasalen Raum eingedrungene Serumeiweiße und des weiteren in den kortikosteroidbehandelten Fällen noch zusätzlich (durch Mobilisation des konstitutiven Hauteiweißes) bereitgestellte Antigene darstellen. Letztere wandern elektrophoretisch genau so wie die Serumeiweiße. Daraus wurde geschlossen, daß sie aufgrund des (zufälligen?) partiellen Besitzes von an sich serum-eigentümlichen Determinanten ebenfalls mit gegen Serumeiweiße gerichteten Antikörpern reagieren und somit Präzipitatlinien bilden konnten.

Ein restlicher Anteil der Fraktion I sowie die Fraktionen II, III und IV bestanden aus höhermolekularen bzw. wasserunlöslichen Pro-

teinen, die nicht in der Lage waren, mit der hier ausgeführten Immunisierungsprozedur registrierbare Antikörper zu evozieren.

Die gewonnenen Ergebnisse beruhen auf dem Vergleich der Präzipitatlinien, die durch Verwendung eines hautunspezifischen (d.h. ungereinigten) Antiserums entstanden sind, zwischen Hautfraktion I und Serum von behandelten und unbehandelten Ratten. Die mit Kortikosteroiden behandelten Ratten weisen im Serum eine Mengenverschiebung von den grobdispersen Globulinen zum Albumin hin auf, in der Haut eine relative Verminderung des Albumins sowie eine absolute Vermehrung des Transferrins und eine relative der α_1 - und δ -Globuline (deren Mengenverhältnis zueinander jetzt beinahe ausgeglichen scheint), wenn man sie den unbehandelten Kontrolltieren gegenüberstellt.

Die unter dem Kortikosteroideinfluß aufgetretenen Unterschiede in den Quantitätsschwankungen der löslichen Hautproteine sind wahrscheinlich Folge der Zusammenspiels verschiedener Raten: einerseits im Sinne der Mobilisierung aus dem Gerüsteiweiß der Haut - andererseits im Sinne der Passage von Serumeiweißen in das Interstitium - zum weiteren im Sinne des lokalen Abbaus. Da die immigrierenden Serumeiweiße mindestens eine, d.h. die subendotheliale, Basalmembran zu passieren haben, wird vermutet, daß die veränderte Passagerate Ausdruck einer von Kortikosteroiden erzwungenen Konstitutionsänderung dieses Gewebsbestandteils ist. Diese offenstehenden Fragen müssen jedoch durch weitere Untersuchungen noch geklärt werden.

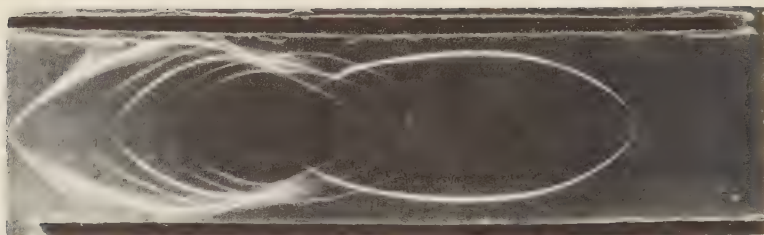


Abb. 1: Serum einer unbehandelten Ratte, dargestellt mit Anti-Rattenhautfraktion I-Antiserum.

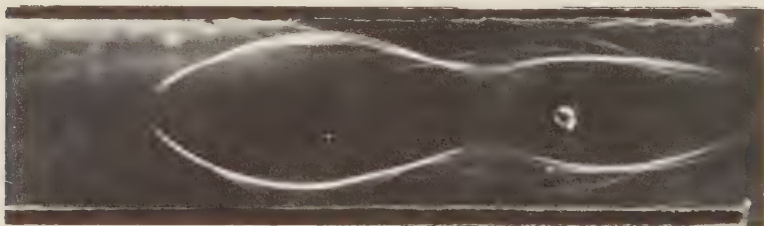


Abb. 2: Hautfraktion I einer unbehandelten Ratte, dargestellt mit Anti-Rattenhautfraktion I-Antiserum.

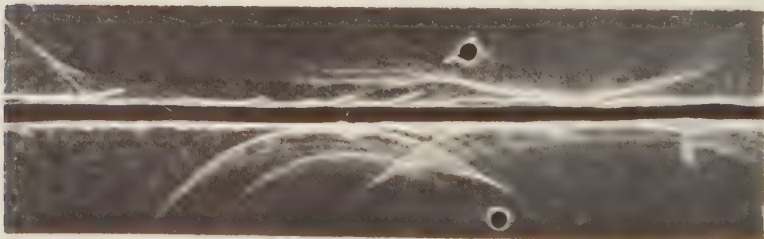


Abb. 3: oben: Hautfraktion I einer unbehandelten Ratte.
unten: Serum der gleichen unbehandelten Ratte.
Darstellung mit Anti-Rattenhautfraktion I-Antiserum.

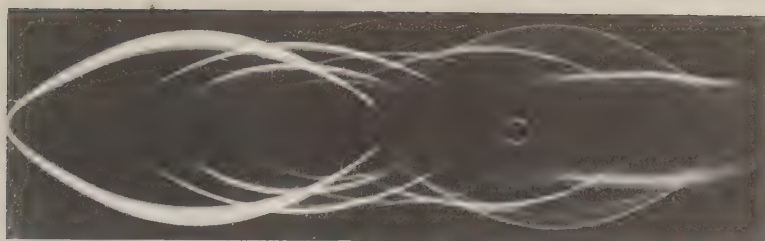


Abb. 4: Serum einer behandelten Ratte, dargestellt mit Anti-Rattenhautfraktion I-Antiserum.

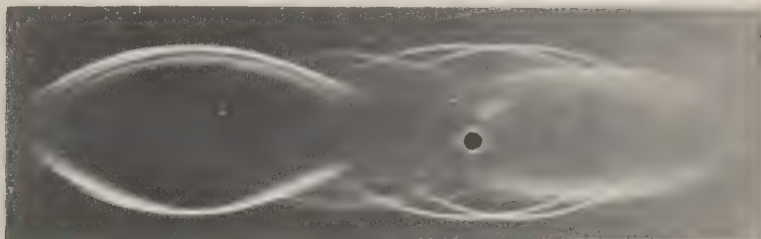


Abb. 5: Hautfraktion I einer behandelten Ratte, dargestellt mit Anti-Rattenhautfraktion I-Antiserum.



Abb. 6: oben: Hautfraktion I einer behandelten Ratte.
unten: Serum der gleichen behandelten Ratte.
Darstellung mit Anti-Rattenhautfraktion I-Antiserum.

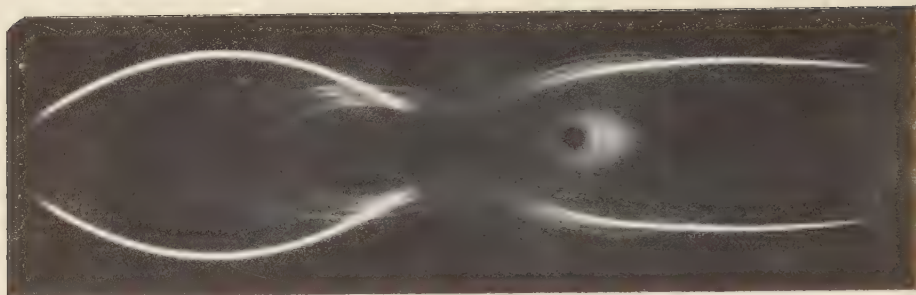


Abb. 7: Serum einer unbehandelten Ratte, dargestellt mit Anti-Rattenserum-Antiserum der Behring-Werke.

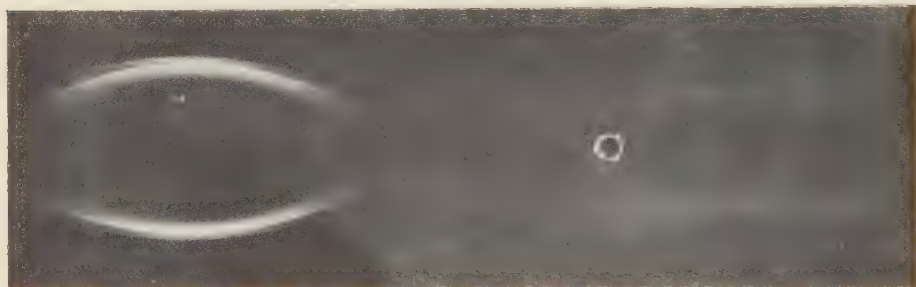


Abb. 8: Hautfraktion I einer unbehandelten Ratte, dargestellt mit Anti-Rattenserum-Antiserum der Behring-Werke.



Abb. 9: oben: Hautfraktion I einer unbehandelten Ratte.
unten: Serum der gleichen unbehandelten Ratte.
Darstellung mit Anti-Rattenserum-Antiserum der Behring-Werke.

Literaturverzeichnis

- 1) J.E. ADAM & G. CRAIG: Striae and their relation to topical steroid therapy.
Canad. Med. Ass. J. 92:289-291 (1965)
- 2) F. ALBRIGHT & E.C. REIFENSTEIN: The Parathyreoid Glands and Metabolic Bone Disease.
Williams & Wilkin Co., Baltimore, 1948
- 3) M. ALLANSMITH, M. GOIHMAN-YAHR & D.N. BUELL: Demonstration of gamma-2-globulin in human skin.
J. of Allergy 35:313-321 (1964)
- 4) H.J. ANTWEILER: Eine Mikroschnellbestimmung der Eiweißstoffe im Serum.
Z. angew. Chem. 59:33-36 (1947)
- 5) H.J. ANTWEILER: Quantitative Mikroelektrophorese.
Kolloid-Z. 115:130-137 (1949)
- 6) H.J. ANTWEILER: Die quantitative Elektrophorese in der Medizin.
2. Aufl., Berlin-Göttingen-Heidelberg 1957
- 7) A.M. ASADI, T.F. DOUGHERTY & G.W. COCHRAN: An electron microscopic study of the ground substance of connective tissue.
Nature 178:1061-1062 (1956)
- 8) G. ASBOE-HANSEN: Om Bindeævnets Mucinoøse Substanser.
Rosenkilde og Bagger, København, 1951
- 9) G. ASBOE-HANSEN: zit. nach 117)
- 10) G. ASBOE-HANSEN: Hormonal effects on connective tissue.
Physiol. Rev. 38:446-462 (1958)
- 11) H.P. BADEN & I.M. FREEDBERG: Studies of epidermal protein metabolism. II. Soluble epidermal proteins.
J. Invest. Derm. 39:401-408 (1962)
- 12) B.L. BAKER & L.F. MONTES: Histochemical changes in the skin following local application of cortisol or prednisolone.
Anat. Rec. 139:133-143 (1961)
- 13) S.A. BARKER, C.N.D. CRUICKSHANK & T. WEBB: The effect of vitamin A, hydrocortisone and citral upon sulphate metabolism in skin.
Exp. Cell Res. 35:255-261 (1964)

- 14) T. BEDNÁŘIK & J. REJNEK: Immunochemical comparison of serum, interstitial and intracellular proteins in the rat.
Physiol. Bohemoslov. 11:542-545 (1962)
- 15) W. BEIGLBÖCK: Chemie und Pharmakologie der neuen Kortikosteroide.
Wiener Med. Wschr. 29:585-592 (1959)
- 16) E.P. BENDITT, S. SCHILLER, H. WONG & A. DORFMAN: Influence of ACTH and cortisone upon alterations in capillary permeability induced by hyaluronidase in rats.
Proc. Soc. Exp. Biol. Med. 75:782-784 (1950)
- 17) N.F. BOAS: Distribution of hexosamine in electrophoretically separated extracts of rat connective tissue.
Arch. Biochem. Biophys. 57:367-375 (1955)
- 18) O. BODANSKY & W.L. MONEY: Rates of development and regression of changes during and after prolonged cortisone administration in rats.
Endocrinology 55:173-185 (1954)
- 19) G.A. BOFFA & J.M. FINE: Les constituants protéiques du sérum de rat.
II. Analyse immuno-électrophorétique.
Rev. Franc. Etud. Clin. Biol. 7:822-828 (1962)
- 20) E.W. BOLAND: Clinical observations with 16- α -methyl corticosteroid compounds. Preliminary therapeutic trials with Dexamethasone (16- α -Methyl-9- α -Fluoroprednisolone) in patients with rheumatoid arthritis.
Ann. Rheum. Dis. 17:376-382 (1958)
- 21) E.T. BOSSAK, CHUN-I-WANG & D. ADLERSBERG: Effect of cortisone on plasma globulins in the dog - Studies by paper electrophoresis.
Proc. Soc. Exp. Biol. Med. 88:634-636 (1955)
- 22) H. BOSTRÖM & E. ODEBLAD: The influence of cortisone upon the sulphate exchange of chondroitin sulphuric acid.
Arkiv för Kemi 6:39-42 (1953)
- 23) E.B. BROWN & Th. SEIDEMAN: Comparison of the clinical effectiveness of methylprednisolone (Medrol) to prednisolone (Delta-Cortef).
Metabolism 7:469-472 (1958)

- 24) E. BUDDECKE: Darstellung und chemische Zusammensetzung von Mukopolysacchariden der Aorta des Menschen.
Hoppe-Seylers Z. physiol. Chem. 318:33-55 (1960)
- 25) P.R. CANNON, L.E. FRAZIER & R.H. HUGHES: The influence of cortisone upon protein metabolism.
A.M.A. Arch. Path. 61:271-279 (1956)
- 26) P.-M. CARSTEN, H.J. MERKER & Th. GÜNTHER: Über den Einfluß von Nebennierenrinden-Hormonen auf Fibrillen und Kittsubstanz der Haut.
Z. für Naturforschung 16 B:680-683 (1961)
- 27) C.W. CASTOR & B.L. BAKER: The local action of adrenocortical steroids on epidermis and connective tissue of the skin.
Endocrinology 47:234-241 (1950)
- 28) C. CAVALLERO & C. BRACCINI: Effect of cortisone on the mast cells of the rat.
Proc.Soc.Exp.Biol.Med. 78:141-143 (1951)
- 29) I. CLARK: The effect of cortisone upon protein synthesis.
J. biol. Chem. 200:69-76 (1953)
- 30) B. CLAUSEN: Influence of age on connective tissue. Hexosamine and hydroxyproline in human aorta, myocardium, and skin.
Lab. Invest. 11:229-234 (1962)
- 31) P.F. D'ARCY & E.M. HOWARD: The effects of prolonged administration of some adrenocortical steroids in the rat.
J.Pharmacy and Pharmacology 14:294-305 (1962)
- 32) V. DOLEŽALOVA, Z. BRADA & A. KOČENT: The behavior of some proteins of normal rat serum studied by gel filtration and electrophoresis.
Biochim. Biophys. Acta 107:294-306 (1965)
- 33) A. DORFMAN: Diskussionsbeitrag zu 147)
- 34) C. DE DUVE, R. WATTIAUX & M. WIBO: Effects of fat-soluble compounds on lysosomes in vitro.
Biochem. Pharmacol. 9:97-116 (1962)
- 35) J.W. DICKERSON & P.M.V. JOHN: The effect of sex and site on the composition of skin in the rat and mouse.
Biochem.J. 92:364-368 (1964)

- 36) J. T. DINGLE: Studies on the mode of action of excess of vitamin A. 3. Release of a bound protease by the action of vitamin A.
- 37) W. DIRSCHERL & H.-L. KRÜSKEMPER: Steroidhormone und Hyaluronidase. Ein Beitrag zur Frage der Wirkungsweise der Nebennierenrindenhormone. *Biochem.Z.* 323:1-13 (1952)
- 38) A. DORFMAN & S. SCHILLER: Effects of hormones on the metabolism of acid mucopolysaccharides of connective tissue.
Rec.Progr.Horm.Res. 14:427-456 (1958)
- 39) F.J. EBLING & P.A. HALE: The composition of female rat skin in relation to region, age, hair growth cycle and hormones.
J. Endocrinol. 36:177-201 (1966)
- 40) N.N. EPSTEIN, W.L. EPSTEIN & J.H. EPSTEIN: Atrophic striae in patients with inguinal intertrigo.
Arch. Derm. 87:450-457 (1963)
- 41) M.J. ESCRIBANO & P. GRABAR: L'analyse immuno-électrophorétique du sérum de rat.
Compt. Rend. Séances Acad. Sciences 255:206-208 (1962)
- 42) I.G. FAZEKAS: Biologischer Nachweis glukokortikoid- und mineralokortikoidartiger Substanzen in der Haut.
Hautarzt 12:203-208 (1961)
- 43) J.P. FISHER: Soluble substances of human stratum corneum. I. Immunochemical and immunological study.
J. Invest. Derm. 44:43-50 (1965)
- 44) J.P. FISHER: Soluble substances and antigens of human epidermis. (Analyses by electrophoresis and immunoelectrophoresis)
J. Invest. Derm. 47:336-350 (1966)
- 45) R. FLEISCHMAJER: Hexoses, hexosamines and aldehydes in human dermal gelatins.
J. Invest. Derm. 51:81-82 (1968)
- 46) R. FLEISCHMAJER & St. KROL: Non-collagenous proteins of human dermis.
J. Invest. Derm. 48:359-363 (1967)
- 47) P. FLEISCH & E.C.J. ESODA: Further studies of epidermal mucopolysaccharides.
Arch. Derm. 88:706-708 (1963)

- 48) J. FREY: Etude d'une méthode d'exploration et du taux normal de l'hydroxyproline du sérum. Biochim. Biophys. Acta 111:440-446 (1965)
- 49) J. FREY, NGUON HOA, J. GRAS, J.C. HENRY & Y. GUDEFIN: Immuno-electrophoresis reveals collagen solubility in human serum. Science 150:751-752 (1965)
- 50) I. GERSH & H.R. CATCHPOLE: The organization of ground substance and basement membrane and its significance in tissue injury, disease and growth. Amer.J.Anat. 85:457-521 (1949)
- 51) L.E. GLYNN & C.A. READING: Interessante Erscheinungen in der Physiologie des Bindegewebes, in: Chemie und Stoffwechsel von Binde- und Knochengewebe. Berlin-Göttingen-Heidelberg, 1956
- 52) P. GRABAR & C.A. WILLIAMS: Méthode permettant l'étude conjuguée des propriétés électrophorétique et immuno-chimique d'un mélange de protéines. Application au sérum sanguin. Biochim.Biophys.Acta 10:193-194 (1953)
- 53) P. GRABAR & P. BURTIN: Analyse immuno-électrophorétique. Masson, Paris, 1960
- 54) H.M. GREY: Studies on changes in the quality of rabbit-bovine serum albumin antibody following immunization. Immunology 7:82-90 (1964)
- 55) Th. GÜNTHER, H.J. DULCE & E. SCHÜTTE: Über den Einfluß der Nebenniere auf den Wasser-, Elektrolyt- und Mukopolysaccharidgehalt der Haut. Naunyn-Schmiedebergs Arch. exp. Path.Pharm. 242:201-206 (1961)
- 56) U. HADDING, F. HARTMANN & R. FRICKE: Immunologische Untersuchungen über die Antigene von Bindegeweben. Z. Rheumaforsch. 22:149-174 (1963)
- 57) R. HAENSCH: Auswirkungen der Kortikosteroide auf das Bluteiweißbild und ihre Bedeutung. Arch.klin.exp.Derm. 213:241-245 (1961)
- 58) R. HAENSCH: Das Serumeiweißbild unter der Kortikosteroid-Therapie. Hautarzt 12:216-220 (1961)
- 59) W. HAUSER: Zur Frage der Entstehung der Striae cutis atrophicae. Derm.Wschr. 138:1291-1295 (1958)

- 60) M. HEIDELBERGER & F.E. KENDALL: Quantitative studies on the precipitin reaction.
J. Exp. Med. 55:555-561 (1932)
- 61) E. HEIKKINEN & E. KULONEN: Collagen components in the consecutive extracts of rat skin.
Acta physiol. scand. 68:231-233 (1966)
- 62) P.S. HENSCH, E.C. KENDALL, C.H. SCLOCUMB & H.F. POLLEY: The effect of a hormone of the adrenal cortex (17-Hydroxy-11-Dehydrocorticosterone: compound E) and of pituitary adrenocorticotrophic hormone on rheumatoid arthritis.
Proc. Staff Mayo Clinic 24:181-197 (1949)
- 63) W.H. HITZIG: Die Plasmaproteine in der klinischen Medizin.
Berlin-Göttingen-Heidelberg, 1963
- 64) P. HOFFMANN, A. LINKER & K. MEYER: The acid mucopolysaccharides of connective tissues. II. Further experiments on chondroitin sulfate B.
Arch. Biochem. Biophys. 69:435-440 (1957)
- 65) J.C. HOUCK: The effect of cortisol and salicylate upon the connective tissue.
Amer. J. Path. 41:365-371 (1962)
- 66) J.C. HOUCK & R.A. JACOB: Chemical dissection of rat skin.
Proc. Soc. Exp. Biol. Med. 105:324-326 (1960)
- 67) J.C. HOUCK & R.A. JACOB: Connective Tissue VII. Factors inhibiting the dermal chemical response to cortisol.
Proc. Soc. Exp. Biol. Med. 113:692-694 (1963)
- 68) J.C. HOUCK & Y.M. PATEL: Proposed mode of action of corticosteroids on the connective tissue.
Nature 206:158-160 (1965)
- 69) R.P. HOWARD, R.L. CRANN & R.H. FUHRMANN: Effects of corticosteroids on serum lipids and lipoproteins in adrenocortical hyperfunction.
J. Lab. Clin. Med. 56:665-672 (1960)
- 70) J.H. HUMPHREY, A. NEUBERGER & D.J. PERKINS: Observations on the presence of plasma proteins in skin and tendon.
Biochem. J. 66:390-399 (1957)
- 71) T.E. HUNT & A.J. BLANCHARD: Rheumatoid nodules. A study in their pathogenesis and the effects of cortisone and ACTH.
Ann.Rheum.Dis. 10:337-346 (1951)

- 72) J. HURYCH & M. CHVAPIL: The role of free hydroxyproline in the biosynthesis of collagen.
Biochim. Biophys. Acta 107:91-96 (1965)
- 73) K. IVERSEN: Hormonal influence on connective tissue, in: Connective Tissue in Health and Disease, ed. G. ASBOE-HANSEN
Munksgaard, København, 1954
- 74) D.S. JACKSON & J.P. BENTLEY: On the significance of the extractable collagens.
J. Biophys. Biochem. Cytol. 7:37-42 (1960)
- 75) M.-F. JAYLE: Biochimie et intérêt clinique des α_1 - et α_2 -séromucoides.
Schweiz.Med.Wschr. 86:1425-1427 (1956)
- 76) D. JENKINS & J.E. SCHEMMELE: Metabolic effects of 6-Methylprednisolone.
Metabolism 7:416-424 (1958)
- 77) E. JORPES & I. YAMASHINA: Die Mukopolysaccharide und Glykoproteide des Bindegewebes, in: Chemie und Stoffwechsel von Binde- und Knorpelgewebe.
Berlin-Göttingen-Heidelberg, 1956
- 78) K. JUNKMANN: Stoffwechselwirkungen der Steroidhormone, in: Stoffwechselwirkungen der Steroidhormone, ed. H. NOWAKOWSKI.
Berlin-Göttingen-Heidelberg, 1955
- 79) K.W. KALKOFF: Hauterscheinungen beim CUSHING-Syndrom.
Z. Haut- u. Geschl.-Kr. 10:361-367 (1951)
- 80) H. KEISER, E.C. Le ROY, S. UDENFRIEND & A. SJOERDSMA: Collagenlike protein in human plasma.
Science 142:1678-1679 (1963)
- 81) H. KINDLER: Die Hemmung der kollagenen Faserbildung durch Kortison.
Langenbecks Arch. klin. Chirug. 319:162-165 (1967)
- 82) K.I. KIVIRIKKO: Hydroxyproline-containing fractions in normal and cortisone-treated chick embryos.
Acta Physiol. Scand. 60 : Suppl. 219 (1963)
- 83) K.I. KIVIRIKKO, O. LAITINEN, J. AER & J. HALME: Studies with ^{14}C -proline on the action of cortisone on the metabolism of collagen in the rat.
Biochem.Pharm. 14:1445-1451 (1965)
- 84) Ch.R. KLEEMAN, J. KOPLOWITZ & M.H. MAXWELL: Metabolic effects of two newer adrenal analogs, 6-methylpred-

nisolone (Medrol) and 6-methyl-9 α -fluoro-21-desoxyprednisolone (9 α -fluoro-21-desoxy-Medrol).
Metabolism 7:425-440 (1958)

- 85) Fr. E. KOCH & H. UEBEL: Experimentelle Untersuchungen über die lokale Beeinflussung der Gewebsresistenz gegen Streptokokkeninfektion durch Kortison und Echinacin.
Arzneimittelforsch. 4:551-560 (1954)
- 86) C.D. KOCHAKIAN & E. ROBERTSON: Adrenal steroids and body composition.
J. Biol. Chem. 190:495-503 (1951)
- 87) K. KOWALEWSKI: Effect of an anabolic steroid upon various fractions of tissue hydroxyproline in cortisone treated rats.
Acta endocrinol. 53:73-78 (1966)
- 88) R.M. KRETSINGER, G. MANNER, B. S. GOULD & A. RICH: Synthesis of collagen on polyribosomes.
Nature 202:438-441 (1964)
- 89) H. LABHART & H. STAUB: zit. nach 63)
- 90) H. LANGECKER: Die Wirkung der Steroidhormone auf Wasser- und Mineralhaushalt, in: Stoffwechselwirkungen der Steroidhormone, ed. H. NOWAKOWSKI.
Berlin-Göttingen-Heidelberg, 1955
- 91) L.L. LAYTON: Cortisone inhibition of mucopolysaccharide synthesis in the intact rat.
Arch. Biochem. Biophys. 32:224-226 (1951)
- 92) A. LEINBROCK: Dysproteinämien in der Dermatologie.
Derm. Wschr. 122:1033-1034 (1950)
- 93) A. LEINBROCK: Dysproteinämien bei Dermatosen.
Z. Hautkr. 9:435-436 (1950)
- 94) A. LEINBROCK: Untersuchungen über das elektrophoretische Serumproteinspektrum bei Dermatosen.
Z. Hautkr. 10:345 (1951)
- 95) A. LEINBROCK: Bedeutung der Serumproteinelektrophorese für die Beurteilung der Therapie bei Dermatosen.
Proc. 10th Internat. Congr. Derm. (London), 1952, pp. 378-379
- 96) A. LEINBROCK: Dysproteinämien bei Dermatosen.
Hautarzt 3:9-21 (1952)

- 97) A. LEINBROCK: Der kutane und allgemeine Reaktionsablauf bei Dermatosen im Spiegelbild inverser Blutproteinbewegungen.
Derm. Wschr. 128:1191-1192 (1953)
- 98) A. LEINBROCK: Erfolg und Versagen der Chemotherapie bei Dermatosen im Spiegelbild der Serumproteinbewegungen.
Arch. Derm. 200:530-536 (1955)
- 99) A. LEINBROCK: Die Elektrophorese in der Dermatologie, in: Die quantitative Elektrophorese in der Medizin, ed. H.S. ANTWEILER.
Berlin-Göttingen-Heidelberg, 1957
- 100) E.C. LeROY, A. KAPLAN, S. UDENFRIEND & A. SJOERDSMA: A hydroxyproline-containing, collagen-like protein in plasma and a procedure for its assay.
J. Biol. Chem. 239:3350-3356 (1964)
- 101) I. LORENZEN & H. ZACHARIAE: Effect of glucocorticoids upon the mucopolysaccharide content of human skin.
Acta Med. Scand. 179:337-341 (1966)
- 102) C.F.C. MacPHERSON & A. LIAKOPOULOU: Studies on brain antigens. 1. Water soluble antigenic proteins.
J. Immunol. 97:450-457 (1966)
- 103) S.C. MADDEN & G.H. WHIPPLE: Plasma proteins: Their source, production and utilization.
Physiol. Rev. 20:194-217 (1940)
- 104) R.E. MANCINI & Y.E. SACERDOTE-DE-LUSTIG: zit. nach 78) und 117)
- 105) R.E. MANCINI, S.G. STRINGA & L. CANEPA: The action of ACTH, cortisone and prednisone on the connective tissue of normal and sclerodermic human skin.
J. Invest. Derm. 34:393-417 (1960)
- 106) R.E. MANCINI, D. VILAR, J.M. DELLACHA, O.W. DAVIDSON, C.J. GOMEZ & B. ALVAREZ: Extravascular distribution of fluorescent albumin, globulin and fibrinogen in connective tissue structures.
J. Histochem. Cytochem. 10:194-203 (1962)
- 107) A.G. MATOLTSY: Soluble proteins in different levels of the epidermis.
J. Invest. Derm. 42:111-114 (1963)
- 108) R. MEY, W. MEDWETH & B. KÜHL: Striae gravidarum und Aktivität der Nebennierenrinde.
Zbl. Gynäkol. 85:1239-1248 (1963)

- 109) K. MEYER: The biological significance of hyaluronic acid and hyaluronidase.
Physiol. Rev. 27:335-359 (1947)
- 110) H.P. MISSMAHL & G. BETZ: Nachweis feinstruktureller Veränderungen der kollagenen Fasern bei Unter- und Überfunktion der Nebennierenrinde.
Med. Welt 17:942-945 (1963)
- 111) O.W. NEUHAUS, R. HAVEZ & G. BISERTE: Fractionnement et identification des protéines sériques du rat.
Compt. Rend. Séances Soc. Biol. 156:1105-1112 (1962)
- 112) M.E. NIMNI & L.A. BAVETTA: Collagen synthesis and turnover in the growing rat under the influence of methyl prednisolone.
Proc. Soc. Exp. Biol. Med. 117:618-623 (1964)
- 113) J.C. OPSAHL: The role of certain steroids in the adrenal-hyaluronidase relationship.
Yale J. Biol. Med. 22:115-121 (1949)
- 114) G.B. PIERCE jr., A.R. MIDGLEY jr. & SRI RAM: The histiogenesis of basement membranes.
J. Exp. Med. 117:339-348 (1963)
- 115) L.O.S. POIDEVIN: Striae gravidarum. Their relation to adrenal cortical hyperfunction.
Lancet 26:436-439 (1959)
- 116) D. PRESSMAN: Antibodies as specific chemical reagents.
Adv. Biol. Med. Phys. 3:100-149 (1953)
- 117) Ch. RAGAN: The physiology of the connective tissue.
Ann. Rev. Physiol. 14:51-72 (1952)
- 118) R.R. RAUSCHKOLB & E.W. RAUSCHKOLB: The distribution of steroid in skin following intravenous injection or local administration.
J. Invest. Derm. 37:1-5 (1961)
- 119) M. RISER, J. DUCOS, L. RIBAUT & M. VARSI: Essai de préparation d'un anticorps actif sur les antigènes du derme.
Compt. Rend. Seances Soc. Biol. 156:516-519 (1962)
- 120) S. ROBERTS: The influence of the adrenal cortex on the mobilization of tissue protein.
J. Biol. Chem. 200:77-88 (1953)

- 121) O.-E. RODERMUND, H. FASOLD, F. TURBA & A. LEINBROCK: Fraktionierung der gesamten Proteine aus Rattenhaut und Charakterisierung der einzelnen Anteile.
Arch. klin. exp. Derm. 226:300-307 (1966)
- 122) O.-E. RODERMUND: Zur Wirkung von Röntgenstrahlen auf die Rattenhaut. Elektrophoretische und chromatographische Untersuchungen.
Arch. klin. exp. Derm. 231:318-328 (1968)
- 123) M.A. ROTHSCILD; S.S. SCHREIBER, M. ORATZ & H.L. MCGEE: The effects of adrenocortical hormones on albumin metabolism studied with albumin- I^{131} .
J. clin. Invest. 37:1229-1234 (1958)
- 124) J.A. RUSSEL: Physiology of the pituitary-adrenal system.
Bull. New York Acad. Med. 26:240-250 (1950)
- 125) G. SANDOR: Quelques considérations concernant la pathogénie de l'augmentation du taux des glucoprotéides et des alpha-globulines du sérum sanguin.
Sang 27:597-602 (1956)
- 126) H.P. SCHEDL & F.C. BARTTER: Serum iron-binding protein levels after infusion of human serum-albumin.
Lancet I: 1163-1165 (1959)
- 127) J.J. SCHEIDEGGER: Une micro-méthode de l'immunoélectrophorèse.
Internat. Arch. Allergy 7:103-110 (1955)
- 128) F. SCHEIFFARTH, H. GÖTZ & G. THUMA: Immunelektrophoretische Studien zur Frage der Identität menschlicher Organ- und Serumproteine.
Clin. Chim. Acta 7:355-365 (1962)
- 129) F. SCHEIFFARTH, F. LEGLER & G. BERG: Das Verhalten der Antistreptolysinreaktion und der Serumweißkörper unter Kortison.
Z. ges. exp. Med. 120:568-577 (1953)
- 130) J. SHEWELL & D.A. LONG: A species difference with regard to the effect of cortisone acetate on body weight, γ -globuline and circulating anti-toxin levels.
J. Hygiene 54:452-460 (1956)
- 131) S. SCHILLER, N. BLUMENKRANTZ & A. DORFMAN: Effect of prednisolone and hydrocortisone on distribution of mucopolysaccharides in the skin of rats.
Biochim. Biophys. Acta 101:135-137 (1965)
- 132) S. SCHILLER & A. DORFMAN: The metabolism of mucopolysaccha-

rides in animals: The effect of cortisone and hydrocortisone on rat skin.
Endocrinology 60:376-381 (1957)

- 133) S. SCHILLER, G.A. SLOVER & A. DORFMAN: Effect of the thyroid gland on metabolism of acid mucopolysaccharides in skin.
Biochim. Biophys. Acta 58:27-33 (1962)
- 134) F. SEILERN-ASPANG, I. SMITH & I. CHRISTIAN: The ratio of soluble to insoluble collagen in normal chick dermis.
Proc. Soc. Exp. Biol. Med. 127:818-820 (1968)
- 135) H. SELYE: The general adaptation syndrome and diseases of adaptation.
J. clin. Endocrinol. 6:117-230 (1946)
- 136) P. SETHI, E.R. RAMEY & J.C. HOUCK: Connective tissue IV. Effect of age upon dermal chemical response to adrenal hormones.
Proc. Soc. Exp. Biol. Med. 108:74-77 (1961)
- 137) R.H. SILBER & C.C. PORTER: Nitrogen balance, liver protein repletion and body composition of cortisone treated rats.
Endocrinology 52:518-525 (1953)
- 138) W.R. SISSON: Colored striae in adolescent children.
J. PEDIATRICS 45:520-530 (1954)
- 139) H. SIUKO, J. SÄVELÄ & E. KULONEN: Effect of the hydrocortisone on the formation of collagen in guinea pig skin.
Acta endocrinol. 31:113-116 (1959)
- 140) J.D. SMILEY & M. ZIFF: Urinary hydroxyproline excretion and growth.
Physiol. Rev. 44:30-44 (1964)
- 141) Q.T. SMITH: Effects of cortisone administration on cutaneous collagen and hexosamine in rats of various ages.
J. Invest. Derm. 39:219-224 (1962)
- 142) Q.T. SMITH: Body weight, cutaneous collagen and hexosamine of cortisone-treated female rats of various ages.
J. Invest. Derm. 42:353-357 (1964)
- 143) H. SOBEL: Diskussionsbeitrag zu 38)
- 144) H. SOBEL, S. GABAY, C. JOHNSON & B. HASSAN: Carcass nitrogen and the hexosamine-collagen ratio of skin following starvation and cortisone admini-

stration in rats and guinea pigs.
Metabolism 8:180-184 (1959)

- 145) H. SOBEL & J. MARMORSTON: The effect of cortisone on the collagen and hexosamine content of the skin and femurs of one year old rats.
Endocrinology 55:21-27 (1954)
- 146) H. SOBEL & J. MARMORSTON: The possible role of the gel-fiber ratio of connective tissue in the aging process.
J. Geront. 11:2-7 (1956)
- 147) H. SOBEL & J. MARMORSTON: Hormonal influences upon connective tissue changes of aging.
Rec. Progr. Horm. Res. 14:457-481 (1958)
- 148) R.G. SPRAGUE: Cortison and ACTH. A review of certain physiologic effects and their clinical implications.
Amer. J. Med. 10:567-594 (1951)
- 149) C. STEFFEN: Serologische und immunologische Untersuchungen über die Spezifität verschiedener Kollagenpräparationen.
Wiener klin. Wschr. 75:894-897 (1963)
- 150) G. STÜTTGEN & T. SCHILLING: Zur Beeinflussung der Proteolyse menschlicher Haut durch Prednisolon, Kallikrein-Inaktivator und Röntgenstrahlen.
Z. ges. exp. Med. 132:51-63 (1959)
- 151) A. TISELIUS: zit. nach 6)
- 152) G. TONELLI, R. PARTRIDGE & I. RINGLER: Body and muscle weight depressing effects and thymolytic potencies of glucocorticoids in the rat.
Proc. Soc. Exp. Biol. Med. 119:136-142 (1965)
- 153) J. URIEL: The characterization reactions of the protein constituents following electrophoresis or immuno-electrophoresis in agar.
in: Analyse immuno-électrophorétique, ed. P. GRABAR & P. BURTIN.
Masson, Paris, 1960
- 154) K. VOIT: Kortison bei schwer verlaufenden akuten Infektionskrankheiten.
Med. Klinik 53:635-638 (1958)
- 155) G. WARNKE: Dissertation in Bonn (im Druck)
- 156) G. WEISSMANN & H.B. FELL: The effect of hydrocortison on the response of fetal rat skin in culture to ul-

traviolet irradiation.
J. Exp. Med. 116:365-380 (1962)

- 157) G. WEISSMANN & L. THOMAS: Studies on lysosomes. II. The effect of cortisone on the release of acid hydrolases from a large granule fraction of rabbit liver induced by an excess of vitamin A.
J. clin. Invest. 42:661-669 (1963)
- 158) A. WHITE, Ph. HANDLER, E.L. SMITH & De WITT STETTEN jr.:
Principles of Biochemistry.
Mc Graw-Hill Book Company, Inc.,
New York-Toronto-London, 1959
- 159) Z.T. WIRTSCHAFTER & J.P. BENTLEY: The influence of age and growth rate on the extractable collagen of skin of normal rats.
Lab. Invest. 11:316-320 (1962)
- 160) G.C. WOOD: The formation of fibrils from collagen solutions. 2. A mechanism of collagen-fibril formation.
Biochem. J. 75:598-605 (1960)
- 161) G.C. WOOD: The formation of fibrils from collagen solutions. 3. Effect of chondroitin sulphate and some other naturally occurring polyanions on the rate of formation.
Biochem. J. 75:605-612 (1960)
- 162) A.S. ZELICKSON: Fibroblast development and fibrogenesis.
Arch. Derm. 88:497-509 (1963)
- 163) L. ZICHA, F. SCHEIFFARTH, E. SCHMID & W. WESCHTA: Vergleichende Untersuchungen über Wirkungseintritt und Wirkungsdauer von Glukokortikoiden am Histamin- und Serotonin-Asthma des Meerschweinchens.
Arzneimittel-Forsch. 11:890-893 (1960)
- 164) J. ZIMMER, M.-T. DUB & F. WORINGER: Deuxième contribution à l'étude des protéines solubles du derme à l'aide de l'immuno-électrophorèse en gélose.
Bull. Soc. franc. Derm. 67:329-331 (1960)
- 165) J. ZIMMER, F. WORINGER & M.-T. DUB: Contribution à l'étude des protéines solubles de derme humain à l'aide de l'électrophorèse et de l'immuno-électrophorèse en milieu gelifié.
Ann. Derm. 88:376-384 (1961)

7

Herrn Professor Dr. med. A. Leinbrock, Ordinarius für Dermatologie an der Universität Bonn, danke ich für die Überlassung des Themas, Herrn Dr. med. O.-E. Rodermund, wissenschaftlicher Assistent an der Universitätsklinik für Haut- und Geschlechtskrankheiten in Bonn, für seine hilfreiche Betreuung.

Fräulein Hoenig-d'Orville bin ich für ihre wertvolle technische Unterstützung sehr verbunden. Frau Voigtländer und Fräulein Weishaar gaben mir aus ihren photographischen Erfahrungen nützliche Hinweise. Allen Damen sei hiermit ebenfalls gedankt.

L e b e n s l a u f

Am 11. Juli 1942 wurde ich in Nordhausen am Harz als zweiter Sohn des Fabrikanten Dr. jur. Rudolf Arnold und seiner Ehefrau Dorothea Arnold geb. Neuhoff geboren.

Von 1948 - 1956 besuchte ich in meiner Heimatstadt die Grundschule und anschließend für 4 Jahre die Wilhelm-von-Humboldt-Oberschule. Am 3. Juni 1960 legte ich dort die Reifeprüfung ab. Ein mir auferlegtes, sogenanntes praktisches Jahr vor Beginn des Medizinstudiums brach ich im Herbst 1960 mit meiner Übersiedelung von Mittel- nach Westdeutschland ab, wozu mich familiäre, politische und ausbildungsbedingte Motive veranlaßten.

Nach dem Besuch eines Vorstudienkurses für SBZ-Abiturienten in Delmenhorst mit abschließender Ergänzungsprüfung begann ich im Wintersemester 1961/1962 in Hamburg das Medizinstudium. Am 3.8.1964 bestand ich in Hamburg das Physikum und setzte meine Fachstudien in Bonn und Wien fort. Das Staatsexamen erfolgte im Anschluß an das Wintersemester 1967/1968 in Bonn.

